

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie

Studijní program Biologie

Studijní obor Biologie



Marie Mračková

Rozlišení parous a nulliparous samic u krevsajícího nematocerního hmyzu

Parous and nulliparous female detection in blood-sucking nematocera insects

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Školitel: Doc. RNDr. Jan Votýpka, PhD.

Školitel specialista: Mgr. Jana Rádrová

Praha 2013

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 4. 2013

Marie Mračková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu docentu Janu Votýpkovi za jeho pomoc, trpělivost a cenné rady při psaní této práce. Stejným dílem bych chtěla poděkovat Mgr. Janě Rádové jak za pomoc při psaní této práce, tak i za velkou pomoc a trpělivost při mých prvních zkušenostech s prací v laboratoři. Poděkování patří také celému týmu laboratoře za velmi přátelský přístup.

Abstrakt

Nematocera (dlouhoroží) patří mezi dvoukřídle (Diptera), jedné z nejpočetnějších a celosvětově nejrozšířenějších skupin hmyzu. Mnozí krevsající zástupci jsou nejenom obtížní trapiči, ale i přenašeči řady nebezpečných patogenů. První část této bakalářské práce shrnuje informace o rozmnožovací soustavě, sání krve, autogenii a vývoji vajíček krevsajících zástupců, které jsou mj. nezbytné pro pochopení problematiky přenosu onemocnění. Stěžejní částí předložené práce je shrnutí poznatků a metod sloužících k rozlišení samic parních (parous; tedy těch, které již kladly) a nuliparních (nulliparous), a to u čtyř medicínsky a veterinárně důležitých skupin nematocerního hmyzu: komárů (Culicidae), muchniček (Simuliidae), flebotomů (Phlebotominae) a tiplíků (Ceratopogonidae, rod *Culicoides*). Znalost parity samic je důležitá pro epidemiologické i ekologické studie, protože pouze parní samice, které již sály na potencionálně nakažených hostitelích, slouží jako zdroj infekce a mohou se zapojit do přenosu patogenů. Největší pozornost je věnována čeledi Culicidae, protože právě od metod používaných u komárů se odvíjí metody i pro jiné skupiny. Některé z postupů, jako například počítání folikulárních dilatací nebo stav tracheol v ováriích, jsou používány u většiny ze studovaných skupin, jiné, jako např. zbarvení stěny abdomenu u tiplíků, platí pouze pro jednu ze skupin.

Klíčová slova: nulliparous, parous, ovária, Nematocera, Culicidae, Simuliidae, Phlebotominae, *Culicoides*

Abstract

Nematoceros insects belong to the order Diptera, one of the largest and worldwide spread groups of insects. Haematophagous species act not only as tormentors, but also as vectors of various pathogens. The first section of this thesis reviews about insect's reproductive systems, multiple blood-feeding, autogeny and development of ova; the information which are necessary for the transmission understanding. The principal topic of the thesis is reviewing methods for distinguishing parous and nulliparous females, which are commonly used for four Nematoceran groups: mosquitoes (Culicidae), black flies (Simuliidae), sand flies (Phlebotominae) and biting midges (Ceratopogonidae, the genus *Culicoides*). The section is focused mainly on family Culicidae, because the methods used for mosquitoes were the groundwork for developing methods suitable for the other groups. Some of the procedures, for example counting follicular dilatations or assessing the condition of tracheoles in the ovaries, are used for most of the studied groups; others, like pigmentation of the abdominal wall in the genus *Culicoides*, can be used only for one group. Knowledge of the female parity is very important for epidemiological and ecological studies, because only parous females, previously blood-fed on infected hosts, can transmit pathogens.

Key words: nulliparous, parous, ovaries, Nematocera, Culicidae, Simuliidae, Phlebotominae, *Culicoides*

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Samičí rozmnožovací soustava hmyzu	3
3. Gonotrofický cyklus a doba přežívání samic	4
4. Způsoby sání.....	6
5. Autogenie	7
6. Metody určování parity	8
6.1. Určování parity samic u komárů (Culicidae).....	9
6.2. Určování parity samic u muchniček (Simuliidae).....	18
6.3. Určování parity samic u flebotomů (Phlebotominae)	22
6.4. Určování parity samic u tiplíků (<i>Culicoides</i>).....	25
7. Závěr	29
8. Seznam použité literatury	30

1. Úvod

Zástupci podřádu Nematocera (dlouhoroží), tvořící parafyletický taxon, náleží do jednoho z nejpočetnějších řádů hmyzu, do dvoukřídlých (Diptera). Jsou charakterističtí svými tykadly, která mají šest a více článků. Tělo a nohy dospělců jsou prodloužené, stejně jako jejich abdomen. V jejich vývoji se objevují eucefalní nebo hemicefalní larvy, které u většiny druhů mají silný vztah k vodě, ale u některých druhů může být tendence k semiakvatickým a pozemním habitatům (Volf, Horák et al., 2007).

Mnozí krevsající zástupci se uplatňují nejen jako trapiči, ale podílejí se i na přenosu patogenů infekčních jak pro člověka, tak pro hospodářská i volně žijící zvířata. Významní jsou zástupci čtyř hematofágních skupin, kterým se tato práce bude věnovat, tj. komárům (Culicidae), muchničkám (Simuliidae), flebotomům (Phlebotominae) a tiplíkům (rodu *Culicoides*).

U krevsajících zástupců dlouhorohých sají krev pouze samičky, které patří k přenašečům nejnebezpečnějších lidských onemocnění. Nasátá krev slouží zejména jako zdroj proteinů pro tvorbu vajíček (Volf, Horák et al., 2007). Důležitý jev, týkající se sání krve a vývoje vajíček, se nazývá gonotrofický cyklus. Samotný cyklus se skládá z vyhledání hostitele, sání a trávení krve, vývoje vajíček, vyhledání místa ke kladení a samotné ovipozice. K plnému vývoji ovárií a následné snůšce vajíček obvykle stačí jen jedno sání. Pro šíření patogenů jsou však důležité zejména ty druhy, které na jednu snůšku sají opakovaně, a kterým mohou během života dozrávat ovária několikrát, přičemž při nedostatečném nasání se vyvíjí jen část folikulů. Některé druhy jsou autogenní, to znamená, že krev k dozrávání první snůšky nepotřebují.

V této práci se budu věnovat více či méně spolehlivým metodám, jejichž cílem je rozlišit samičky, které již měly alespoň jednu snůšku, takové samičky označujeme jako parní (angl. parous), od samiček, které ještě žádnou snůšku neměly, tedy samiček nuliparních (angl. nulliparous). V některých případech je dokonce možné určit, kolikrát již samičky kladly (jednou parní, dvakrát parní, atd.). Pokud samice nakladly více než jednu snůšku, označují se obecně jako multiparní (angl. multiparous). Metody na rozpoznání parity se většinou zakládají na morfologických změnách různých orgánů, ke kterým dochází během oogeneze. Někdy se však hodnotí pouze stáří samiček bez přímé návaznosti na kladení, a to podle různých fyziologických a morfologických znaků. Stáří samiček však není jednoznačným důkazem kladení a používá se pouze k rozdělení samic do různých věkových kategorií s různou

pravděpodobností odpovídající dané paritě samic. Na takto vybrané samice se pak mohou aplikovat přímé metody určování parity.

Mnoho zástupců hematofágních dvoukřídlých vykazuje gonotrofickou konkordanci, což znamená, že samice sají na každou snůšku pouze jednou. Z epidemiologického hlediska jsou však důležité zejména ty druhy, které gonotrofickou konkordanci nevykazují, protože právě tyto druhy sají na jednu snůšku několikrát, a tím zvyšují šanci na přijetí a přenos patogenu.

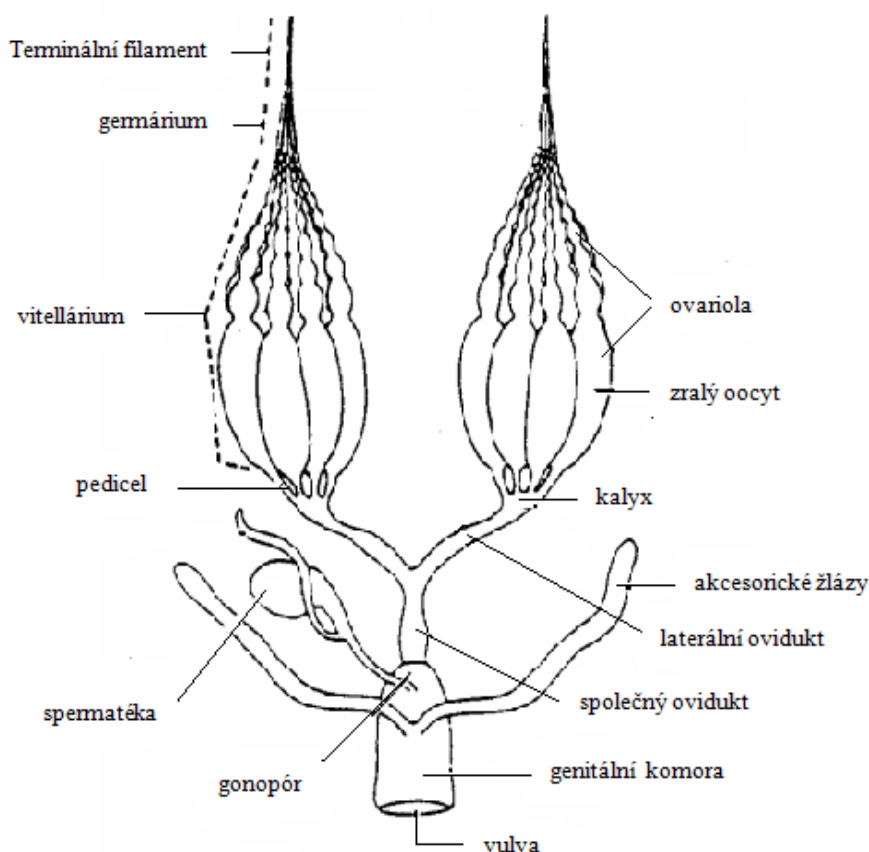
S přijatou obratlovčí krví mohou samičky přijmout i patogen, a pokud je samička nuliparní, znamená to, že dosud ještě nesála krev, a tudíž za normálních podmínek ještě nemůže být přenašečem. Pokud však některý druh vykazuje autogenii, jedno sání na jednu snůšku za život nebo transovariální přenos, může sice metoda určit paritu samic, ale tato informace nemá vztah k přenosu patogenu. Transovariální přenos je jev, kdy patogen přítomný v samici napadá i její vaječníky, dostává se do vajíček a přenáší se tak do další generace samic, které tak mohou být infekční již při prvním sání na hostiteli.

Také znalost doby přežívání přenašečů je důležitá k porozumění populační dynamiky a vektorové role v přenosu nemocí. Patogen potřebuje určitou dobu, než se vektor stane infekčním. Aby se stala samice přenašečem, musí přežít tak dlouho, než se patogen stane infekčním pro obratlovčího hostitele (Watanabe et al., 1980). Obecně platí, že čím déle samice žijí, tím více gonotrofických cyklů dokončí, a proto je počet dokončených gonotrofických cyklů krevsajícího hmyzu v přírodě důležitý faktor ovlivňující jejich schopnost přenášet nemoci (Gryaznov, 1995).

Rychlé a metodicky dostupné rozlišení parních samic se využívá v epidemiologických studiích, zaměřujících se právě na potenciálně nakažené parní samičky. Toto rozlišení se využívá i v monitorování biologie vektorů, což napomáhá při eradikačních zásazích proti nim. V neposlední řadě se věkové kategorizování využívá i při hledání místa rozmnožování, které je u některých druhů těžko nalezitelné (McFarland et Magy, 1962). Většina dosavadních metod je však značně náročná a vyžaduje pitvy a případně i další speciální mikroskopické techniky, a proto by bylo vhodné vyvinout nové, snadnější, levnější a rychlejší metody.

2. Samičí rozmnožovací soustava hmyzu

Reprodukční orgány různých skupin hmyzu jsou sice velmi variabilní, přesto však můžeme najít obecné charakteristické znaky (viz Obr. 1). Hlavní funkcí samičích pohlavních orgánů je produkce vajíček včetně tvorby jejich ochranných struktur a skladování samčích spermií do doby, než jsou vajíčka připravena k oplodnění.



Obr. 1. Schéma samičí reprodukční soustavy. Převzato a upraveno od Kodríka (2004)

Pohlavní soustava samice se skládá z párových ovárií, která jsou tvořena ovariolami. Každá ovariola je tvořena terminálním filamentem¹, apikálním germáriem, bazálním vitelláriem a pedicelem a je v ní uložena série folikulů, připojených proximálně k oviduktu, do kterého jsou zralá vajíčka vypuzena na konci každého oogenetického cyklu (Jupp et Collins, 1979). Germárium slouží k tvorbě oocytů. Ve vitelláriu probíhá vitellogeneze, což je proces, kdy oocyt roste a vyvíjí se díky akumulaci žloutku. Funkci epitelu vyvíjejícím se oocytům plní folikulární buňky, které se tvoří v germáriu a začínají se řadit podél stěn

¹ Terminologie a české názvy použité v této bakalářské práci byly převzaty ze skript: **Kodřík D. (2004)** Fyziologie hmyzu - učební texty, Entomologický ústav Akademie věd České republiky a Biologická fakulta Jihočeské

ovarioly na hranici germária a vitellária. Spolu tvoří útvar zvaný folikulus, který je složený právě z folikulárních buněk, oocytu a trofocytů (Kodrík, 2004).

U dvoukřídlých jsou ovarioly meriostického typu, polytrofní. Takové ovarioly obsahují trofocyty, což jsou specializované nutritivní buňky, které jsou součástí oocytu. Všechny ovarioly se na bazální části spojují do oblasti zvané kalyx, který ústí laterálními ovidukty do společného oviduktu. Ten ústí gonoporem do genitální komory, spolu s dvěma typy žláz ektodermálního původu. První z nich je spermatéka, kde se ukládají spermie až doby fertilizace. Druhá se nazývá akcesorická žláza a její sekret zpravidla slouží k ochraně a přilepení vajíček k povrchu. Celá rozmnožovací soustava samice je zakončena vývodem zvaným vulva (Kodrík, 2004).

3. Gonotrofický cyklus a doba přežívání samic

Samotný gonotrofický cyklus se skládá z vyhledávání hostitele, sání a trávení krve, vývoje vajíček, vyhledávání místa k ovipozici a ze samotného kladení vajíček.

Mnoho hematofágních skupin jsou charakteristické gonotrofickou konkordancí, neboli gonotrofickou harmonií. Při tomto procesu prochází změnami střední střevo, folikuly a vznikající oocyt (Ryšavý et al., 1989).

Vývoj vajíček během ovariálního cyklu je charakterizován a rozdělen do několika stádií na základě folikulového vývoje: fáze N, I, II, III, IV a V (Christopher, 1911). Ovariální cyklus je definován jako perioda mezi úspěšnými ovipozicemi u hmyzu, ve kterém se folikuly v různých ovariolách vyvíjejí synchronně a vajíčka jsou vykladena přibližně ve stejnou dobu (Tyndale-Biscoe, 1984). Existuje však také jev nazývaný asynchronní oogeneze. Druhy jako například *Phlebotomus papatasi* mají oocyty v namixovaných stádiích vývoje. Asynchronní vývoj oocytů v těchto samicích může být způsoben současnou vaječnou produkcí z uschovaných larválních energetických rezerv a následně z obratlovčí krve (Magnarelli et al., 1984).

S vývojem vajíček úzce souvisí trávení krve a spolu prochází několika fázemi s možnými odchylkami u různých skupin hmyzu. Nejprve se vytvoří folikulární epitel, který ohraničuje skupinu nediferencovaných buněk. Primární folikuly jsou kulovitého tvaru a folikulární epitel ani jádro oocytu nejsou viditelné. Tato fáze se značí N a vyskytuje se u samic čerstvě vylíhlých. Vytvořený folikul, který se dostane do fáze I, se začíná prodlužovat a oocyt, trofocyty a sesterské buňky se začínají diferencovat, na rozdíl od folikulárního epitelu, který zůstává nediferencovaný. V této fázi je již vidět i jádro oocytu a shluk

žloutkových granulí. Do fáze, označované jako fáze II, vše probíhá bez příjmu krve a ovariální vývoj dál nepokračuje až do sání krve, což značí, že druh je anautogenní a gonotroficky konkordantní. Jedná se o odpočívající nebo diapauzující stádium, ve kterém vyvíjející se oocyt zabírá až polovinu folikulárního prostoru a funkční folikul se stává oválným díky akumulaci žloutku. V této fázi je již zřejmý kubický epitel. Po nasátí se folikul dostane do fáze III. Střední střevo (mesenteron) je plné jasné červené krve, množství žloutku se zvětšuje a sesterské buňky jsou nahnuté k posteriorní části folikulu a oocyt stále roste. Ve fázi IV se již mezi jasné červenou krví objevují tmavší skvrny, oocyt zabírá půl až tři čtvrtě délky folikulu a sesterské buňky se i nadále tlačí na proximální konec folikulu. Žloutek je již přítomný skrz naskrz folikulárního prostoru. Ve fázi V je ve střevě již téměř strávená černá krev, vajíčka jsou zralá, velmi prodloužená s viditelnou strukturou chorionu s micropyle a připravená se odpojit od ovariooly a opustit vaječný váček (Christopher, 1911; Jupp et Collins, 1979; Ryšavý et al., 1989; Gryaznov, 1995; Mahmood et Crans, 1998).

Důležitou součástí, týkající se dané problematiky, je i studium přežívání vektora, které může být použito ke srovnání relativní účinnosti různých druhů vektorů v přenosu. Obecně platí, že čím starší samice, tím více dokončených gonotrofických cyklů. Nejčastěji používaná metoda je počítání průměrné parní hodnoty, což odhaduje úspěšnost přežívání samic přes jeden gonotrofický cyklus (Bellis et Reid, 1996) a vysoká parní hodnota značí vysokou hodnotu přežívání. Delší přežívání vektora umožňuje například snadná dostupnost krve nebo dosažitelnost ovipozičního a odpočívacího místa s vhodnými environmentálními podmínkami (Lima-Camara et al., 2007). V kontrastu s tím je naopak vysoká mortalita ovlivněná nepříznivými environmentálními podmínkami, predací, parazitizmem, nemocemi a vlastní ovipozicí. Největší úmrtnost samic je následně po první ovipozici a další po následující ovipozici atd. (Self et Pant, 1968).

Délka gonotrofického cyklu se může lišit s různými klimatickými podmínkami, jako třeba s měnící se teplotou (Takaoka et al., 1982), a proto může vykazovat sezónní variace v rámci areálu rozšíření (Porter et Collins, 1985). Také má dopady na frekvenci kontaktu vektor-hostitel (Rodriguez et al., 1992) a hodnota přežívání určuje celkovou produkci vajíček a stabilitu velikosti populace vektora (Miller et al., 1973). Délka gonotrofického cyklu (Mutero et Birley, 1987), přežívání vektora (Birley et Rajagopalan, 1981) a dokonce i klimatické podmínky proto ovlivňují vektorovou kapacitu přenosu patogena. Gonotrofický cyklus přímo souvisí s frekvencí sání a dlouhověkost s dobou potřebnou k získání patogenů a případné infekci hostitele při následném sání (Garcia-Rejon et al., 2008). K odhadu doby

přežívání během gonotrofického cyklu populace v daném věku je nezbytné znát paritu a interval mezi úspěšnými sáními (Gillies et Wilkes, 1963).

Samice hematofágního hmyzu vykazují během gonotrofického cyklu fáze jako je odpočívání, během něhož dochází ke zrání vajíček, ovipozice, disperze a hledání hostitele. Tyto fáze však komplikují naši schopnost zaznamenat všechny věkové skupiny příslušné populace a jsou příčinou obtížné interpretace výsledků (Birley et Boorman, 1982).

4. Způsoby sání

Pro plný vývoj vajíček obvykle stačí jedno tzv. kontinuální sání. Některé druhy ale sají diskontinuálně, což znamená, že musejí přijímat potravu několikrát, aby se vajíčka v rámci jedné snůšky vyvinula. Takové druhy jsou z epidemiologického hlediska obzvlášť důležité, neboť společně s druhy, kterým vajíčka dozrávají během života několikrát, mohou přenášet na své hostitele různé patogeny.

Některé druhy vyžadují více než jedno sání krve ke kladení jejich první snůšky a velké množství z nich poprvé saje ještě před kopulací (Gillies et DeMeillon, 1968). Důvodem jsou v krvi obsažené esenciální aminokyseliny (např. izoluecin), které jsou rozhodující pro vitellogenezi (Harrington et al., 2001).

Opakované sání může být zjištěno podle stavu krve ve středním střevu. Čerstvá krev je jasně červená, natrávená krev tvoří namodralou nebo nahnědlou sraženinu s červeným centrem a stará, téměř strávená krev je hnědá, a je jí jen malé množství (Rosay, 1969a). Dokonce i samotný patogen může způsobit zvýšený příjem krve na jednu snůšku, nebo sníží apyrázovou aktivitu ve slinách vektora, čímž způsobí nedostatečné nasátí díky zvýšenému obrannému chování obratlovčího hostitele, což nutí vektora sát opakovaně a zvyšuje šanci patogenu na přenos (Scott et al., 2006). Opakované sání obecně zvyšuje vektorový potenciál a má vliv na počet infekčních bodnutí, kterým je hostitel vystaven (Norris, 2010).

Životní strategii založenou na opakovaném sání během jednoho gonotrofického cyklu mají například komáři *Aedes albopictus*² (MacDonald, 1956) a *Ae. aegypti* (Scott et al., 1993), *Anopheles arabiensis*, *An. gambiae*, *An. funestus* (Norris, 2010), *Phlebotomus papatasi* (Schmidt et Schmidt, 1965), i někteří flebotomové rodu *Lutzomyia*, kteří jsou dokonce schopni sát krev těsně před ovipozicí je-li dostupný vhodný hostitel (Christensen et Herrero, 1980).

² Dále v textu bude pro rod *Aedes* používána zkratka *Ae.*; pro rod *Anopheles* zkratka *An.*; pro rod *Culex* zkratka *Cx.*; tak jak je to běžné v parazitologických textech, i když se to částečně vymyká zoologickým zvyklostem.

5. Autogenie

Autogenie je vlastnost mnoha zástupců krevsajících dvoukřídlých a umožňuje ovariální vývoj bez příjmu krve (Hugo et al., 2008). Autogenie je tedy zavádějící zdroj parity samic, kdy nález parních samic nemusí nezbytně znamenat, že sály krev a mohly získat patogen. Má-li samice oocyty ve třetím a pozdějším stádiu folikulového vývoje a ve středním střevě nemá obsaženou žádnou krev, pak je u ní možný autogenní vývoj (Magnarelli et al., 1984). Ačkoli autogenní vývoj vajíček inhibuje vyhledávání hostitele a sání krve u několika druhů komárů (Klowden, 1996, cit. dle Kassem et Hassan, 2003), chybí zatím důkaz takovéto inhibice u všech krevsajících dipter.

Studie na komárech naznačily, že fenomén autogenie se mohl objevit jako výsledek bohatých larválních zásob stejně tak jako výsledek obtížného získávání krve (Clements, 1963, cit. dle Lewis, 1965). Fekundita autogenních samic při první snůšce závisí na tom, v jakých potravních podmínkách se larvy vyvíjejí (Kal'chenko, 1962). Většinou platí, že je mnohem nižší než po sání krve (Schmidt, 1965), ale z některých studií vyplývá, že počet vajíček zrajících po sání krve se signifikantně neliší od počtu vajec produkovaných autogenně (Magnarelli et al., 1984). Pokud mají larvy extrémně dobré potravní podmínky, může se vyskytnout i druhá autogenní snůška (Kal'chenko, 1962).

Stupeň autogenie se počítá jako procento samic, které mají bez přijetí krve ovariální folikuly ve III a pozdějším stádiu (Kassem et al., 2003). Hodnota autogenie se mezi různými druhy liší, a může být buď obligatorní, jako je tomu například u *Simulium nigrum*, *S. niaculatum* (Gryaznov, 1995), *P. bergeroti* (Kassem et al., 2003), nebo fakultativní, jako například u *S. equinum*. Mezi další druhy, u kterých se autogenie v nějaké podobě objevuje, patří *S. ornatum*, *S. vittatum* a *S. venustum-verecundum* superkomplex (Gryaznov, 1995). Také mnoho druhů rodu *Aedes* se vyznačuje autogenií, jako např. *Ae. vigilax* (Detinova, 1962) a *Ae. taeniorhynchus* (Bellamy et Corbet, 1974), z rodu *Culex* pak například *Cx. pipiens molestus* (Prabhaker et Sutherland, 1975), *Cx. tarsalis* (Bellamy et Corbet, 1974) a *Cx. nigripalpus* (Nayar et Knight, 1981a). Ani podčeleď Phelebotominae není výjimkou a je známo, že kromě obligatorního *Phlebotomus bergeroti* k autogenii dochází i v některých populacích *P. papatasi* (Lewis and Minter, 1960, cit. dle Lewis et al., 1970), *P. gomezi* (Johnson, 1961), *Lutzomyia cruciata* (Lewis, 1965), *L. davisii* a *L. damascenoi* (Lewis et al., 1970).

6. Metody určování parity

Stěžejní částí této práce je přehled dosavadních metod použitých pro určení parity samic nematocerního krevsajícího hmyzu. Určit fyziologický věk dospělců lze několika více či méně spolehlivými metodami. Hodnocení parity se provádí nejčastěji na základě morfologických změn (viz tab. 1) a použité metody mohou být rozděleny do tří hlavních kategorií. První je na základě vnějších znaků vzniklých opotřebením věkem, jako například třepení křídla. Do druhé kategorie spadají somatické změny objevující se s věkem, jako jsou růstové pruhy v kutikule, přítomnost nebo absence mekonie a změny v tukovém tělese. Třetí kategorie zahrnuje změny v reprodukčním systému, jako například změny na ováriích a tracheolách zásobující ovária (Tyndale-Biscoe, 1984). Samozřejmě do těchto kategorií náleží i další znaky, které budou uvedeny níže. Pokud je jedna metoda doplněna metodou druhou, výsledky jsou přesnější a spolehlivější.

Tabulka 1. Hlavní metody určování parity samic u čtyř skupin krevsajícího nematocerního hmyzu

	Culicidae	Simuliidae	Phlebotominae	rod Culicoides	obtížnost pitvy ³
Metody rozlišující více kategorií parity⁴					
folikulární dilatace ^{33, 40, 49, 61, 63, 82, 105, 111, 115, 134}	ANO	ANO	ANO	ANO	✓✓
zóny granulace ¹⁰⁵	/	ANO	/	/	✓✓
granulární bazální tělíska ^{42, 45, 107}	ANO	ANO	/	/	✓✓
ovariální olejová injekce ^{39, 43, 49, 107, 130}	ANO	ANO	/	ANO	✓✓✓
ovariální separační technika ⁴⁶	ANO	/	/	/	✓✓✓
reliktní vajíčka ²⁴	/	ANO	/	/	✓
Metody rozlišující pouze parní a nuliparní samice					
tracheoly ovárií ^{20, 28, 49}	ANO	/	/	ANO	✓
velikost ampully ^{74, 133}	ANO	/	/	/	✓
malpighické trubice ¹⁰⁵	/	ANO	ANO	/	✓
akcesorické žlázy ^{2, 32, 64}	/	/	ANO	/	✓✓
genitální atrium ¹¹⁰	/	/	ANO	/	✓✓✓
obecný vzhled ovárií ^{28, 31}	/	/	ANO	ANO	✓
laterální abdominální pigmentace ³¹	ANO	/	/	ANO	/
vzor pigmentace na abdominálních tergitech ⁶⁶	/	/	/	ANO	/
Metody určující věk samice					
kutikulární růstové pruhy ^{83, 102}	ANO	/	/	/	✓

³ Znak ✓ značí míru obtížnosti pitvy. Čím více ✓, tím je pitva náročnější, vyžadující velké zkušenosti.

⁴ Čísla dolních indexů jsou čísla vybraných citací v seznamu literatury, které metodu poprvé popisují, nebo dále rozvádějí.

kutikulární hydrokarbonová analýza ^{26, 27}	ANO	/	/	/	/
mekonium ve středním střevě ^{28, 49, 93, 105}	ANO	ANO	/	/	✓
zelené zbarvení ^{25, 58}	ANO	/	/	/	/
pigmenty pteridiny ^{15, 86, 116, 118}	ANO	ANO	/	/	✓
externí opotřebení ^{108, 132}	ANO	/	/	/	/
přítomnost svalových zbytků ⁹⁴	ANO	/	/	/	✓
profilování genové transkripce ¹⁹	ANO	/	/	/	/
tukové tělísko v haemocoelu ¹⁰⁵	/	ANO	ANO	/	✓

6. 1. Určování parity samic u komárů (Culicidae)

Komáři byli jako nejdůležitější přenašeči řady onemocnění objektem mnoha studií věkového třídění, a právě u nich byla vytvořena metoda rozlišování parity. Do současnosti byla popsána řada metod, které budou níže stručně rozvedeny.

Tracheoly ovárií

Vynikající a poměrně jednoduchá metoda pro rozlišení parních a nuliparních samic je založená na pozorování tracheol v ováriích. Poprvé byla použita u rodu *Anopheles* (Detinova, 1962).

Zakončení jemných tracheol, zásobujících stěnu ovária, jsou u nuliparních samic v tenkých klubíčkách nebo svazcích. Jakmile se stěna protáhne, aby se přizpůsobila růstu prvních vyvíjejících se folikulů, klubíčka se rozbálí a nikdy se již nevrátí zpět do původních tenkých svazků. Ve smršťném ováriu, po první a následných ovipozicích, vznikají volné tracheální sítě, tvořené rozpadlými tracheolami, což je znamení parity (Detinova, 1962). Může se také vyskytnout přechodný typ, který nemá typické charakteristiky parních, ale ani nuliparních samic (Blackmore et Dow, 1962). Částečně odvinuté tracheoly mohou vznikat v důsledku zrání i jen několika vajíček, autogenii nebo nekompletnímu sání krve (Kardos et Bellamy, 1961).

Nedostatkem metody je rozdělení samic pouze na dvě kategorie, a to na parní a nuliparní (Hugo et al., 2008) a použitelnost je omezená na samice s prázdným abdomenem nebo obsahující čerstvou krev (Jupp, 1973). Metoda však nevyžaduje přílišné pitevní dovednosti a stala se rutinní a úspěšnou procedurou, která je široce používána ke zjištění poměru parity komárů a tím i hodnoty jejich přežívání. Je opakovaně hodnocena jako vyhovující, rychlá a přesná například pro severoafrické druhy *Cx. fatigans*, *Cx. pipiens*, *Cx. theileri*, *Cx. univittatus* (Jupp, 1973), dále pro *Cx. annulirostris* (Kay, 1979), *Cx. tarsalis* (Kardos et Bellamy, 1961), *Cx. portesi* a *Cx. taeniopus* (Davies et al., 1971, cit. dle Jupp,

1973) a *Ae. vigilax* (Hugo et al., 2008). Lze říci, že je to metoda aplikovatelná na komáry obecně, ačkoli stupeň tracheolárního sbalení u nuliparních samic se liší druh od druhu (Corbet, 1959).

Folikulární dilatace

Další důležitá metoda pro věkové třídění, označovaná jako Polovodova metoda (Polovodova, 1949, cit. dle Tyndale-Biscoe, 1984), je oproti předchozí komplikovanější, vyžadující značnou pitevní a interpretační zručnost. Umožňuje však determinovat multiparitu, tedy počet jednotlivých vaječných snůšek. Přesné stanovení parity použitím této metody vychází z předpokladu, že dilatace jsou tvořeny jen během gonotrofického cyklu a že na ovariole je tvořena pouze jedna dilatace v každém cyklu. Původní studie stanovení nuliparních samic se tedy opírá o absenci dilatací (Fox et Brust, 1994).

Za dobu zkoumání problematiky dilatací se objevila celá řada názvů pro folikulární dilatace, jako například *corpus luteum* – žluté tělísko (Colless, 1958) a mnohé další. Nejvíce používaný je termín folikulární relikt, který ve skutečnosti tvoří obsah dilatace (Anderson, 1964). Mnozí autoři však používají termín folikulární relikt bez ohledu na to, kde byl v ovariu nalezen. V této práci je termín folikulární dilatace používán, pokud jsou reliktů uspořádány do charakteristické korálkovité struktury. Jednoduchá folikulární dilatace je používána, pokud je v intimě nalezen pouze jeden relikt, zatímco žluté tělísko je používáno, jestliže je relikt na bázi ovariole (Tyndale-Biscoe, 1984). Akumulace folikulárních reliktů závisí na povaze intimy. U malých druhů je však pitva ovariol pro zjištění folikulárních reliktů téměř nemožná.

Folikulární dilatace se formují na pedicelu každé ovariole po vypuzení oocytů, a jsou popsány tři typy dilatací. První typ je dilatace vzniklá kontrakcí váčku roztažené ovariolární pochvy, vzniklého průchodem zralých vajíček elastickým pedicelem k oviduktu. Deformace pedicelu je ireverzibilní. Během následujícího gonotrofického cyklu se vyvíjí další vaječný folikul anteriorně k malé oddělené dilataci, vzniklé po první ovipozici (Lehane et Laurence, 1978) a s dalšími cykly se na ovariole, s dokončenými více gonotrofickými cykly, formuje řetízek dilatací. Dilatace jsou obvykle stejně velké jako germárium, které je lokalizované distálně k oocyту. Jak se oocyty zvětšují, dilatace se naopak zdají menší (Rosay, 1969a).

Každá z dilatací obsahuje v rozšířené intimě folikulární debris. Degenerující debris, zahrnující epitelové a sesterské buňky, je nazýván právě folikulárním reliktem. Po ovipozici se intima spolu s debris v ní smršťují (Lehane et Laurence, 1978). U některých druhů intimě trvá několik dní než se po ovipozici scvrkne a vytvoří kompaktní folikulární dilataci.

Kumulativní velikost a denzita dilatací mohou poskytnout vodítko k počtu dokončených ovipozicí (Tyndale-Biscoe, 1984) a obvykle přetrvávají po celý život samice (Lehane et Laurence, 1978). Počet dilatací koresponduje s počtem úspěšných ovipozic, a slouží tedy jako indikátor parity. Mnoho autorů nazývalo samotné dilatace jako folikulární relikty, dnes je však známo, že folikulární relikty je pouze obsahem dilatací.

Druhý typ je dilatace vzniklá z degenerujících oocytů, trofocytů a folikulových buněk v ovariole (Watts et Smith, 1978). Degenerace proběhne, pokud oocyty zůstávají v ovariu po proběhlé ovipozici nebo pokud ovipozice neproběhne vůbec (Yajima, 1970). Pokud je ale samice ve stavu diapauzy, k degeneraci dochází velmi zřídka (Oda et al., 1978).

Pedicel spojuje primární folikul s kalyxem, tudíž jestliže primární folikul degeneruje, potom pedicel připojuje dilataci ke kalyxu a samotné dilatace se připojují ke každé další spojujícími stopkami (Tyndale-Biscoe, 1984). Podle popisu ovarialní dynamiky se pedicel zachovává, pokud folikul degeneruje, na rozdíl od pedicelu s ovariolami, které prošly ovipozicí, kde je zničen ovulací (Fox et Brust, 1994). Pokud ovariola s degenerovanými folikuly neprošla ovipozicí, pak má intima folikulární dilatace a pedicel je v úzkém a smrštěném stavu. Jestliže jsou dilatace tvořeny degenerací a ovariola při dalším cyklu projde ovipozicí, dilatace zmizí a intima je protáhlého tvaru, v čele s folikulárním reliktem. V některých ovariolách vajíčka degenerují, zatímco z jiných ovariol jsou vykladena (Tyndale-Biscoe, 1984) a počet degenerovaných folikulů závisí na nutriční hodnotě krve (Hosoi, 1954, cit. dle Yajima, 1970). Maximální počet dilatací však vždy koresponduje s počtem gonotrofických cyklů, a proto jsou nazývány gonotrofickými dilatacemi (Tyndale-Biscoe, 1984), které jsou dobře pozorovatelné např. u *Cx. pipiens pallens* (Hosoi, 1954, cit. dle Yajima, 1970) nebo *Cx. tritaeniorhynchus* (Oda et al., 1978).

Třetí typ jsou dilatace vniklé resorpcí vajíček, nazývané agonotrofické dilatace; jejich počet však neodpovídá počtu ovipozicí, které mohly být dokončeny. Resorbované folikuly pravděpodobně vznikají kvůli nedostupnosti krve nebo nedostatečné akumulaci energetických rezerv ihned potom co folikuly vstoupí do stádia II (Nayar et Knight, 1981b) a neznačí tedy sání krve. Resorbující folikuly mohou být po přijetí krve samicí zcela funkční a začnou se normálně vyvíjet. Je však velmi obtížné rozlišit mezi gonotrofickými a agonotrofickými dilatacemi (Lange et Khok, 1981, cit. dle Tyndale-Biscoe, 1984). Tento fenomén lze pozorovat např. u *Cx. tarsalis* (Bellamy et Corbet, 1974), *Cx. nigripalpus* (Nayar et Knight, 1981b), *An. maculipennis* (Polovodova, 1949, cit. dle Tyndale-Biscoe, 1984), *An. gambiae*, *An. funestus* a *An. coustani* (Detinova et Gillies, 1964).

Jednoduchá folikulární dilatace – V tomto případě je v intimě pozorována pouze jediná dilatace za největším vyvíjejícím se folikulem, nezávisle na tom, kolika gonotrofickými cykly samice prošla. Dilatace může být ve formě nafouklého váčku před úplnou kontrakcí intimy po ovipozici nebo ve formě kompaktní folikulární dilatace (Tyndale-Biscoe, 1984).

Důvod jen pro jednu dilataci se liší u jednotlivých druhů. Úspěšně vzniklé dilatace mohou vzájemně splynout, např. u *Cx. pipiens quinquefasciatus*, *Cx. tarsalis* (Rosay, 1969b) a *An. melas* (Giglioli, 1965). Je také možné, že se intima může u některých druhů natrhnout během ovipozice, a to v bodě blízko předtím vzniklé dilatace (mezi terminálním a dalším vyvíjejícím se folikulem), a proto může být přítomna jen recentní dilatace. Pak mohou být rozlišeny pouze parní a nuliparní ovária (Giglioli, 1965) a tento stav byl pozorován např. v několika druzích rodu *Culex* (Kay, 1979; Nayar et Knight, 1981b).

Žluté tělísko – Vzniká ihned po ovipozici na distálním konci dalšího vyvíjejícího se folikulu. Folikulární epitel zůstává jako prázdný váček volně v protáhlé ovariole a jak váček kontrahuje, vzniká folikulární relikt, který je spuštěn dolů do regionu kalyxu a zde se označuje jako žluté tělísko. Když je další vajíčko vykládáno, vznikne další váček. V mnoha druzích se žlutá tělíska akumulují na bázi ovarioley a jejich počet roste s rostoucím počtem ovipozicí a vytváří se korálkovitá struktura. Jejich barva je často žlutá nebo hnědá a jejich přítomnost nevylučuje přítomnost dilatací. Relikty se akumulují jak v intimě, vznikající folikulární dilatace, tak v kalyxu, vznikající žluté tělísko. Protože žlutá tělíska jsou mnohem snáze vidět než samotné folikulární dilatace, používají se přednostně v rutinních pitvách pro hodnocení parity komárů (Tyndale-Biscoe, 1984).

Obecně platí, že nuliparní samice nemají obvykle žádnou dilataci, jednou kladoucí samice mají jednu dilataci atd. Komplikací jsou autogenní druhy, kde je část folikulů v prvním cyklu resorbovaná, zatímco další pokračují ve vývoji, což vede k folikulárním dilatacím v některých ovariolách gravidních a nuliparních samic (Bellamy et Corbet, 1974).

Obtížnost pitvy způsobuje, že je možné z celkového počtu sledovat pouze malé procento ovariol (Hoc et Wilkes, 1995b) pro vyšetření terminálních struktur jako dilatací a pedicelů. U samic stejného věku však může být velký rozsah v počtu dilatací na jednotlivých ovariolách (Kay, 1979), a proto je nutné dbát na vznik abnormálních nebo aberantních dilatací, které se také na ovariolách vyskytují, jestliže primární folikul nedozrál a degeneroval nebo se resorboval (Nayar et Knight, 1981a). Pokud je ovariola aberantní, znamená to, že má více dilatací než je počet dokončených cyklů a tudíž se počet dilatací nerovná fyziologickému věku. Aberantní ovarioley byly pozorovány u různých druhů komárů rodu *Culex*, protože u nich probíhá kontinuální vznik folikulů z germária (Bellamy

et Corbet, 1974; Nayar et Knight, 1981a). Naopak aberantní dilatace nebyly pozorovány u rodů *Aedes* nebo *Anopheles*, protože zde vznik folikulů germáriem končí po primárním folikulu, který dosáhne stádia II a další vývoj stimuluje až příjem krve (Rosay, 1969b).

Podle nové hypotézy ovariální dynamiky mohou být dilatace ztraceny z většiny ovariol, jestliže v posledním gonotrofickém cyklu dojde k normální ovulaci v těchto ovariolách, protože ovulace rozbije pedicely a odstraní všechny stopy předchozích dilatací v dané ovariole (Fox et Brust, 1994). Počet ovariol končících v úzkém pedicelu s diagnostickým počtem dilatací (počet je roven počtu dokončených gonotrofických cyklů) se může snižovat s následujícími cykly (Hugo et al., 2008), z důvodu střídání folikulového zrání a degenerace v jednotlivých ovariolách (Tyndale-Biscoe, 1984).

Seriální dilatace byly zaznamenány jen u řádu Diptera a jsou známé u mnoha komárů zahrnující kromě rodů *Anopheles*, *Aedes* a *Culex* také rody *Culiseta*, *Mansonia* a *Psorophora* (Betram et Samarawickrema, 1958, cit. dle Silver, 2008; Detinova, 1962; Rosay, 1969b; Kay, 1979; Magnarelli, 1980; Fox et Brust, 1996).

Není výjimkou, že u stejného druhu někteří autoři napočítali jen jednu dilataci v ovariolách, které prošly několika gonotrofickými cykly, zatímco jiní zjistili seriální dilatace (např. Giglioli (1965) vs. Snow et Wilkes (1977) u *An. melas*), naopak poměrně dobře lze zaznamenat mnohočetné dilatace u druhů rodu *Aedes* (Carpenter et Nielsen, 1965). Obecně lze říci, že dilatace reprezentují každý ovipoziční cyklus. Většinou posteriorní dilatace reprezentují první ovipozici a anteriorní jsou nejnovější.

I když metoda umožňuje rozlišit více kategorií samic, je poměrně obtížná a není zcela přesná. Může to být i kvůli elastické konektivní tkáni mezi ovariolami, která inklinuje k přitáhnutí ovariol zpět do shluků a skryje tak pozorované dilatace (Kay, 1979). Ještě obtížnější je použití této metody u malých druhů komárů, kvůli jejich velikosti a křehkosti ovariolárního pouzdra. Bylo pozorováno, že s fyziologickým věkem se snižuje korelace mezi počtem dilatací a počtem ovipozicí u některých druhů, a to převážně u rodu *Culex* (Kay, 1979). Z toho důvodu je více spolehlivá metoda zakládající se na ovariálních tracheolách, zejména pro *Culex* spp. (Nayar et Knight, 1981a).

Podle novějších studií se však zdá, že vaječný váček nekontrahuje do formy následné a trvalé dilatace, ale spíše každý nový váček vzniklý po ovipozici v úspěšném gonotrofickém cyklu se sloučí se zbytky předchozích váčků v ovariola-kalyxovém spoji. Mnohonásobné folikulární dilatace v komárech se objevují jen jako výsledek abortivní nebo abnormální oogeneze (Sokolova, 1994, cit. dle Smith et Hayton, 1995).

Granulární bazální tělíska

Někdy mohou být dilatace obsahující folikulární relikty viděny jako granulace (Hoc, 1996a), které vznikají jako výsledek ovulace, po které se bazální tělíska, funkční buněčné struktury v nejvíce posteriorní bázi každé ovarioley, stávají granulárními (Hoc et Schaub, 1995). Přítomnost granulárních bazálních tělísek tedy indikuje paritu. Velikost a tvar tělísek se liší druh od druhu, záleží na fyziologickém věku a rozdílu mezi ovariolami toho samého ovária (Hoc, 1996a).

Spencer (1979) vypracovala klíč pro rozlišení parních kategorií u *An. farauti*. Důležitost klade na přítomnost nebo absenci globulí v ovarialní pochvě. Pokud je granulace přítomna, tak se samice hodnotí podle vzhledu a pozice této granulace ve váčcích ovariol a podle kontrahovaných dilatací. Nuliparní ovária nemají žádnou granulaci, a tudíž jsou průsvitná. Rozptýlenou granulaci v rozšířené intimě a bez oddělených shluků mají samice uniparní (jednou kladoucí), kompaktní shluky jednotlivých granulí mají samice biparní, zatímco kompaktní skupiny ve dvojicích nebo trojicích mají samice triparní. Skupiny z kompaktních granulí, které překrývají oocyt, a s ovarialní pochvou se světlými úložišti globulí mají quadriparní samice.

Každá ovariola je postupně delší po úspěšných ovulacích a v intimě se zvyšuje množství globulí, roste jejich velikost a optická denzita. Hoc et Schaub (1995) popsali jednoduchou metodu pro rozlišení nuliparních od parních komárů barvením pitvaných ovárií s neutrální červení. Bazální tělíska parních samic vykazují permanentní granulaci, kterou lze lehce obarvit. Metoda je vyzkoušená například u komárů *Ae. aegypti*, *Ae. togor*, *An. gambiae* a *An. stephensi* a muchniček *S. lodi* a *S. voras*, a její výhodou je rychlost, přesnost a jednoduchost (Hoc, 1996a).

Ovariální olejová injekce

Tato obtížná a časově náročná metoda je v podstatě modifikovaná metoda počítání ovarialních dilatací. Spočívá v rychlém rozříznutí ovarialní pochvy jemnými pitevními jehlami, což má za následek rozprostření ovariol na sklíčko a snazší vyšetření jejich dilatací. Do oviduktu se vstříkne světlý parafinový olej, čímž se ovária rozšíří a zlepší se vizualizace ovariol (Hoc, 1996b). Původní technika zahrnuje ruční aplikaci, dnes se však používá mikroinjekční aparát s mikromanipulátorem (Hugo et al., 2008).

Je umožněno sledování ovarioley *in situ* (stále uchycené ke kalyxu přes pedicel) a také dalších diagnostických struktur, jako jsou granulární bazální tělíska (Hoc, 1996b). Parní samice se poznají tak, že se po vstříknutí oleje do společného oviduktu naplní olejem obě

ovária, zatímco u nuliparních samic musí být ovária naplněná odděleně, protože laterální ovidukty jsou uzavřené elastickou membránou (Lange et al., 1981, cit. dle Silver, 2008). Tato metoda je vyzkoušená u *Ae. cantans* (Hoc et Charlwood, 1990) a *Ae. aegypti* (Hoc et Schaub, 1996).

Ovariolární separační technika

Vznikla modifikací předchozí metody a používá Carnoy roztok, který fixuje ovária. Její podstatou je oslabení ovariální pochvy a separace ovariol. Je o něco snadněji proveditelná, ale vyžaduje přesné načasování, aby se zabránilo poškození ovariol (Hoc et Schaub, 1996).

Kutikulární růstové pruhy

Fenomén kutikulárních růstových pruhů lze pozorovat u některých druhů hmyzu a poprvé byly pozorovány u kobylek (Neville, 1963). Podobné pruhy byly později pozorovány u komárů rodu *Anopheles* a bylo zjištěno, že denní ukládání kutikuly na skeletálních apodemách může sloužit k určení jejich věku (Schlein et Gratz, 1973). Tato metoda může být použita jen ve vztahu ke kalendářnímu věku mladých dospělců a není spolehlivá, pokud je hmyz vystaven extrémním teplotám, protože ukládání kutikuly může být buď inhibováno, nebo naopak urychleno.

Kutikulární hydrokarbonová analýza

Metoda plynové chromatografie kutikulárních uhlovodíků je založená na relativní abundanci tří kutikulárních uhlovodíků: pentakosanu ($C_{25}H_{52}$) a nonakosanu ($C_{29}H_{60}$) pokud se analyzuje celé tělo samic a oktakosanu ($C_{28}H_{58}$) pokud se analyzují pouze nohy. Pro stanovení věku jsou vhodnější pouze nohy, protože je zde menší kontaminace mastnými kyselinami a tudíž i variabilita kutikulárního uhlovodíku (Desena et al. 1999a,b). Podle abundance daných uhlovodíků lze odhadnout přibližný věk samic od vylíhnutí.

Velikost ampully

Protože ampulla na anteriorním konci společného oviduktu roste během ovipozice a po vykladení se již do původní velikosti nevrací (Mer, 1932), může být její průměr použit pro odlišení nuliparních a parních samic, což potvrdila Polovodova (1941, cit. dle Silver, 2008), která popsala kvalitativní změny v ampulle před a po ovipozici. Dokonce se průměr ampully v některých případech (*An. gambiae*) liší i podle počtu sání krve a ovariálního vývoje (Davidson, 1955, cit. dle Silver, 2008).

Mekonium ve středním střevě

Po zakuklení odpadá larvální epitel středního střeva a tvoří neprůhlednou, žlutohnědou až zelenou masu uvnitř středního střeva, která se nazývá mekonium (Romoser et al., 2000) a je tvořené biliverdinem nebo insectoverdinem.

U komárů se světlým integumentem může být mekonium viděno přes abdominální stěnu na segmentech IV-V (Detinova, 1962), je však rychle degradováno hydrolytickými enzymy a ve střevě zůstává maximálně 49 hodin po vzniku dospělé (Rosay, 1961).

Přítomnost mekonia stejně jako tracheolárních klubíček je indikátor nuliparity samic a u autogenních druhů je spolehlivější metoda pro určování nuliparních samic právě přítomnost mekonia. Kombinací těchto dvou metod se dosáhne mnohem přesnějších výsledků, než je tomu při jejich odděleném užití. Nedostatkem metody je, že dokáže rozlišit pouze velmi mladé, a tedy nuliparní samice. Tato metoda je vyzkoušená například u druhu *Ae. vigilax* (Hugo et al., 2008).

Zelené zbarvení

Zelené zbarvení u dospělců bylo poprvé popsáno u komárů komplexu *Cx. pipiens* (Colless, 1958; Rosay, 1961), jako indikátor nuliparity však bylo popsáno až později (De Meillon et al., 1967) a kromě těchto druhů bylo zelené zbarvení pozorováno i u *Cx. annulirostris* (Kay, 1979). Alespoň u *Cx. pipiens quinquefasciatus* se zelené zbarvení zřetelně vyskytuje na ventrálních a laterálních částech thoraxu a abdomenu. Z thoraxu zbarvení zmizí přibližně po 48 h a z abdomenu po 72 h, a proto tento znak může být dobrým vodítkem pro identifikaci nově vylíhlých samic (De Meillon et al., 1967).

Pigmenty pteridiny

U různých skupin hmyzu, jsou různé pigmenty užitečným znakem při věkovém třídění, protože se obvykle jejich kvantita a intenzita mění s věkem. Nejznámější pigmenty asociované s věkem jsou fluorescenční substance zvané pteridiny. Jsou to degradační produkty metabolismu purinů syntetizované v tukovém tělese. (Zeigler et Harmsen, 1969). Vysoká vnitrodruhová variabilita ve fluorescenci pigmentů mezi jedinci stejného věku však omezuje použitelnost této techniky a většího úspěchu lze dosáhnout modifikací s aplikací reverzní fáze HPLC (high performance liquid chromatography) např. u *An. gambiae* a *An. stephensi* (Wu et Lehane, 1999). Fluorescence je nepřímě úměrná věku, což znamená, že koncentrace pteridinů se s věkem snižuje, jak bylo dokázáno u *An. albimanus*. U krví krmených samic je korelace celkové koncentrace pteridinů s věkem nižší než u cukrem

krmených, navíc dochází ke značné variabilitě, a proto není ani tato metoda k určení věku zcela vhodná (Penilla et al., 2002).

Externí opotřebení

Do roku 1930 byl stupeň opotřebení na křídlech běžně používanou metodou k rozlišení mezi starými a mladými komáry (Perry, 1912, cit. dle Silver, 2008). Takové opotřebení bylo pozorováno i u *Ae. albopictus*, kde se samice podle parity liší stupněm poškození křídla – parní samice samozřejmě vykazují větší poškození než nuliparní (Suzuki et al., 1993). Tato metoda je však pouze orientační, i když velmi rychlá a jednoduchá.

Další znaky

Abdominální pigmentace, která se běžně vyskytuje u tiplíků (rod *Culicoides*), byla pozorována též u některých druhů komárů, jako např. *Cx. annulirostris*. Nejlépe je pigmentace vidět na abdominálních segmentech IV–V, ale může být rozšířená podél celého abdomenu. Pigmentace byla nalezena i v tukových těliscích asociovaných s ovárií (Kay, 1979).

Další možnou metodou pro určení nuliparity je přítomnost svalových zbytků z vývojových stádií v dospělosti. Tyto degenerující svaly tvoří průhlednou tkáň lokalizovanou mezi střevem a abdominální stěnou, která mizí během 12–59 h po vzniku (Rosay, 1961).

Souhrn

Závěrem lze říci, že byla popsána řada metod pro určení věku a parity samic komárů. Počítání seriálních dilatací a intervaly mezi úspěšnými gonotofickými cykly mohou poskytnout odhad věku samic (Gillies et Wilkes, 1965), který však lze zjistit více způsoby, nejenom pitevními. Věk samic například u *Ae. egypti* lze stanovit na kontinuální časové škále použitím kutikulární hydrokarbonové analýzy (Desena et al., 1999a,b) nebo pomocí profilování genové transkripce (Cook et al., 2006), u níž se předpokládá nejpřesnější věková predikce. Tyto moderní metody věkového třídění reprezentují změnu z jednoduchých, původních pitevních technik k více specializovaným biochemickým a molekulárně biologickým metodám, jejichž nevýhodou jsou však vysoké náklady (Hugo et al., 2008).

Podle načtené literatury mohu říci, že i když kořeny většiny metod sahají do poloviny 20. století, některé z nich jsou stále velmi oblíbené a často používané. Pro zjišťování přesného počtu snůšek se využívá metoda folikulárních dilatací, kdy se pro lepší vizualizaci některých struktur může do ovária vstříknout olej. Pokud stačí pouze rozdělení na parní nuliparní

samice, používá se spíše metoda založená na pozorování tracheol ovárií. Většina ostatních metod umožní rozlišit samice pouze do věkových kategorií, ale už neurčí, jestli je samice parní nebo nikoli. Tyto metody však usnadní vybrat určitou část populace, u které je pravděpodobné, že jsou parní a až na takto vybraných samicích se uplatňují metody, které přímo určí paritu. V dnešní době patří mezi často používané metody věkového třídění profilování genové transkripce nebo i kutikulární hydrokarbonové analýzy, avšak tyto metody jsou příliš drahé a mohou je tedy využívat pouze některé laboratoře. Z levnějších metod věkového třídění se poměrně často používá přítomnost mekonie ve středním střevě.

6. 2. Určování parity samic u muchniček (Simuliidae)

Stejně jako u komárů je i u muchniček více metod, které se používají pro určení věku a parity a tím i k určení počtu dokončených gonotrofických cyklů. Sleduje se například přítomnost nebo absence dilatací na ovariolách a barva folikulárních reliktů, dále barva a morfologie malpighických trubic, velikost tukového tělíska, přítomnost reliktních vajíček a přítomnost mekonie (Smith et Hayton, 1995).

Folikulární dilatace

Dilatace se určují podle roztažení ovariolární intimy a mohou být buď velké a váčkovité s průsvitnými a bledými folikulárními relikty (indikující relativně nedávnou ovipozici) nebo malé a kompaktní se žlutými a opticky denzními folikulárními relikty. Občas byl zjištěn i intermediální stav (Smith et Hayton, 1995). Názory na to, kdy se váček po ovipozici kontrahuje, se liší. Podle jedné studie se kontrahuje během několika dní (Arkhipova, 1966, cit. dle Smith et Hayton, 1995), ale Cupp et Collins (1979) uvádějí, že jsou váčky plně kontrahované do 24 hodin.

Polovodova metoda předpokládá, že po každé ovipozici kontrahuje roztažená ovariolární pochva do formy dilatace na pedicelu. Po každém úspěšném gonotrofickém cyklu vznikne trvalá dilatace a počet dilatací se rovná počtu dokončených gonotrofických cyklů (Smith et Hayton, 1995). U muchniček však platí, že po první ovipozici začíná v ováriích proces degradace a některé ovariole ztratí germárium nebo terminální folikul. Po druhé ovipozici se tyto procesy vyskytují ve více ovariolách a přibližně polovina ovariol je neschopná produkovat vajíčka ve třetím gonotofickém cyklu. Z uvedeného lze vyvozovat, že reprodukční strategie muchniček je produkovat maximální počet vajíček v minimální počtu

gonotrofických cyklů (Gryaznov, 1995) a právě pokles ve fekunditě je např. používán k určení věku odchycených muchniček *S. damnosum* (Morky, 1980).

Dalším problémem použití Polovodovi metody (popsané výše) je, že u muchniček nemohou být ve většině případů detekované mnohočetné dilatace, protože často zcela mizí (Smith et Hayton, 1995). Po vzájemném splynutí se nazývají stejně jako u komárů jednoduché folikulární dilatace a poprvé byly pozorované u *S. damnosum* (Lewis, 1960). Obvykle lze tedy rozlišit samice pouze na nuliparní a parní, bez možnosti určení počtu dokončených gonotrofických cyklů (Gryaznov, 1995). Mnohočetné folikulární dilatace se taktéž objevují jen jako výsledek abortivní nebo abnormální oogeneze. Jen několik málo autorů pozorovalo mnohočetné dilatace jako důkaz dokončených gonotrofických cyklů, například u *S. ornatum*, *S. erythrocephalum*, *S. nigrum* a u superkomplexu *S. venustum-verecundum* (Gryaznov, 1995). Zdá se, že přetrvávající folikulární reliktů se buď nevyskytují (Magnarelli et Cupp, 1977) nebo nejsou detekovatelné použitím běžných metod.

U muchniček se rovněž používá neutrální červeň k barvení ovariolárních struktur, které indikují předchozí gonotrofické cykly. Během gonotrofického cyklu dochází k různým procesům jako je vaječný vývoj zakončený ovulací, degenerace terminálního folikulu, která probíhá synchronně se zráním vajíček v dalších ovariolách, kdy vzniká folikulární dilatace a dochází i k reabsorpci folikulu. Barvení tedy slouží k odlišení normálních ovariol, které mají germárium i terminální folikul, a abnormálních ovariol bez germária nebo terminálního folikulu (Gryaznov, 1995).

Spolehlivějšího určení počtu gonotrofických cyklů je dosaženo, pokud se spolu s dilatacemi sledují i zóny granulace, vznikající jako výsledek lýzy a apoptózy tkáně vajíčku (Smith et Hayton, 1995), čili reabsorbce vajíčkových váčků v každém gonotrofickém cyklu. Zóny granulace vypadají jako fragmentované prstence a lze je pozorovat jako shluky granulí různých velikostí. Součet zón granulace a folikulárních reliktů v každé ovariole může indikovat počet dokončených gonotrofických cyklů. Samotný počet folikulárních dilatací nekoresponduje s počtem předchozích gonotrofických cyklů a není spolehlivý pro determinaci parity samic, navíc v některých ovariolách parous samic mohou být germárium a terminální folikul ztraceny (Gryaznov, 1995).

Studie na komárech mohou vysvětlovat jev pozorovaný i u muchniček, kdy je v samicích s větším počtem gonotrofických cyklů nalezena jen jedna terminální dilatace (Smith et Hayton, 1995). Morfologie ovariol a populační dynamika muchniček jsou podobné komárům a teoreticky by tedy měly také vznikat ovariole s mnohočetnými dilatacemi

(Gryaznov, 1993), ale ovariola, ve které s každým gonotrofickým cyklem dochází k abortování/degeneraci folikulu, je u muchniček vzácná (Smith et Hayton, 1995).

Folikulární dilatace byly pozorovány například u *S. venustum* (Davies, 1963), *S. downsi* (Darsie et Merino, 1981) a *S. ochraceum*, kde jsou ale viditelné pouze do šesti dnů po ovipozici (Jupp et Collins, 1979).

Ovariální olejová injekce

U relativně robustních a elastických ovárií muchniček je tato metoda, původně popsaná u komárů, poněkud obtížná. Kromě toho po rozříznutí ovariální pochvy mají ovarioly často tendenci se shlukovat, spíše než aby se oddálily (Hoc, 1996a). Metoda byla proto modifikována (Gryaznov, 1993) tak, aby ovariolární struktury, jako je důležitý ovariola-kalyxový spoj, byly zachovány. Parafinový olej používaný v této metodě umožňuje jasnější rozlišení ovariolární stavby a tato technika byla použita např. u *S. woodi* (Hoc et Wilkes, 1995a).

Reliktní vajíčka

Ve srovnání s jinými skupinami krevsajících nematocer je nález reliktních vajíček v ováriích parních muchniček společný velkému množství druhů (Davies, 1963). Mimoto je tato metoda velmi rychlá, a proto hojně používaná. Počet reliktních vajíček uchovaných v ováriích po ovipozici se s počtem snůšek zvyšuje, avšak důvod, proč jsou reliktní vajíčka u muchniček tak běžná a proč jejich frekvence s věkem roste, není známý (Smith et Hayton, 1995).

Malpigické trubice

Metoda je výhodná díky rychlosti, se kterou mohou být trubice vyšetřeny. U nově vylíhlých nuliparních samic jsou malpigické trubice hustě sbalené s neprůhledným materiálem uvnitř a s drsným povrchem, navíc mohou být dvoubarevné – distální části jsou světlehnědé a proximální žlutohnědé až oranžovohnědé. Ztráta granulárního materiálu se zdá být úměrná věku a jeho barva se mění ze žlutohnědé u nuliparních k červenohnědé u parních samic (Smith et Hayton, 1995). Barva malpigických trubic a rozsah granulárního materiálu souvisí se sáním krve a červená barva granulace je pravděpodobně způsobena hematinem (Anderson, 1987, cit. dle Smith et Hayton, 1995) a tomu odpovídá i skutečnost, že malpigické trubice parních samic po dokončeném autogenním gonotrofickém cyklu nevykazují žádné změny, jak bylo pozorováno například u *S. vittatum* (Smith et Hayton, 1995). Metoda je vyzkoušená například u *S. venustum*, *S. parnassum* a *Eusimulium aureum* (Smith et Hayton, 1995).

Mekonium ve středním střevě

Přítomnost mekonia může být použita k rychlé identifikaci nuliparních samic některých druhů muchniček, ale pouze na začátku sezóny, jako například u *S. venustum*. Mekonium rychle zmizí a jeho přítomnost nebo absence je tedy málo použitelná pro věkové třídění, ale metoda je vhodná pro sledování příchodu nové kohorty nuliparních samic do původní populace (Smith et Hayton, 1995).

Tukové tělísko v haemocoelu

Larvální tukové tělísko občas přetrvává po krátkou dobu v dospělých. Tento znak je použitelný pro určení věku některých druhů, zejména pro odlišení nuliparních samic a k detekování nových vln nuliparních samic uprostřed sezóny. Množství tukových zásob v muchničkách se liší nejen s věkem, ale i v závislosti na nutričních a environmentálních faktorech líhnišť (Smith et Hayton, 1995). S věkem se velikost tukového tělíska snižuje jak bylo zjištěno např. u *S. ornatum* (Davies, 1957) a *S. damnosum* (Duke, 1968). Počet samic s tukovým tělískem v přírodě může být ale mnohem menší než u samic chovaných v laboratoři, zejména u druhů jako je *S. ochraceum* (Watanabe et al., 1980).

Pigmenty pteridiny

Pteridiny u muchniček byly objevené v hlavě a studované byly ve vztahu k věku a velikosti samice a také ve vztahu k okolní teplotě (Millest et al., 1992). Využity byly při hodnocení věkové struktury přírodních populací *S. soubrense*, *S. sanctipauli* (Post, 1986) a *S. sirbanum* (Millest et al., 1992) a pteridiny akumulující se s věkem byly nalezeny také v očích *S. damnosum* (Cheke et al., 1990).

Souhrn

Znalosti populační dynamiky muchniček jsou poměrně chudé a této problematice se specificky věnuje jen několik málo studií (Davies, 1963; Magnarelli et Cupp, 1977). Podle mého názoru není u muchniček žádná spolehlivá metoda, podle které by se samice mohly rozdělit do více kategorií na základě počtu snůšek. Metoda folikulárních dilatací může maximálně určit, zda je samice parní nebo nuliparní. Sledování reliktních vajíček, jejichž výskyt lze spolehlivě pozorovat v podstatě pouze u této čeledi, může odhalit přibližný počet snůšek. Mnoho autorů se však spokojí pouze s odhadem věku na základě metod jako je pozorování změn v malpigických trubicích, popřípadě přítomnost tukového tělesa, podle kterého usoudí, zda určitá samice již mohla mít snůšku či nikoli.

6. 3. Určování parity samic u flebotomů (Phlebotominae)

Většina laboratorně chovaných samic zemře během nebo krátce po ovipozici, pravděpodobně kvůli nepřírodným podmínkám laboratorních chovů nebo absenci esenciálních živin (Killick-Kendrick, 1978). Odhad fyziologického věku u flebotomů je omezen na rozlišování parních a nuliparních samic a toto rozlišení je prováděno pomocí tří orgánů: akcesorické žlázy, ovária a genitálního atria.

Akcesorické žlázy

Akcesorické žlázy jsou vysoce specializovaný orgán, který má vývod v apikální části společného oviduktu. Jsou to párové struktury trubkovitého tvaru prodělávající morfologické a funkční změny během vývoje oocyty a jejich sekrety regulují reprodukci (Fausto et al., 1997). Jsou tvořeny žlázovým epitelem, který se po nasátí krve diferencuje a začne sekretovat produkt skládající se z globulárních granulí. Během gonotrofického cyklu se žlázové epiteliální buňky kontinuálně uspořádávají a žlázový lumen obklopený tímto epitelem roste a plní se sekretovaným materiálem (Fausto et al., 1997), který je uvolňován při ovipozici. Některá zbylá granula zůstávají ve žlázách a mohou sloužit jako indikátor parity samic, někdy je však zbytků málo a žláza pak vypadá jako u nuliparních samic (Lewis et al., 1970). Žlázy nově vylíhlých samic jsou malé a téměř prázdné nebo jen s několika granulemi (Shoshina, 1951, cit. dle Fausto et al., 1997).

Na počátku této metody stojí Adler et Theodor (1935), kteří objevili, že akcesorické žlázy *Phlebotomus perniciosus* sekretovaly granula po sání krve a že některé z granul zůstávaly i po ovipozici. Později různí autoři vyšetřovali řadu druhů flebotomů na přítomnost granulace v akcesorických žlázách a stanovili tuto metodu jako spolehlivou např. pro některé tropické africké flebotomy (Lewis et Minter, 1960, cit. dle Lewis, 1970), nebo naopak jako velmi nepřesnou pro některé palearktické druhy (Shoshina, 1951, cit. dle Lewis, 1970). Granulace byla dokonce nalezena i v nuliparních samicích, které sekretovaly v akcesorických žlázách granula ještě před sáním (Johnson et Hertig, 1961), a to např. u *P. perniciosus* (Fausto et al., 1997). Metoda je považována za poměrně spolehlivou např. pro *P. papatasi* (Dolmatova, 1942, cit. dle Lewis, 1970), *Lutzomyia longipalpis* (Adler et Mayrink, 1961) a *Sergentomyia garnhami* (Minter, 1964), naopak nespolehlivá pro *L. flaviscutellata* a *L. furcata* (Ready et al., 1984).

Přítomnost granulárního materiálu uvnitř akcesorických žláz není sama o sobě dostačující k určení, zda samice dříve sála nebo ne. Nicméně sekreční materiál uložený

v lumen žlázy je častější ve žlazách parních než nuliparních samic, stále se však vedou debaty, zda lze přítomný reziduální materiál považovat za indikátor parity či nikoli. Chybu v interpretování metody akcesorických žláz může zapříčinit nepravidelná či snížená sekrece, efekt opakovaného sání, vypuštění veškerého sekrečního materiálu a předčasná aktivita žláz (Lewis et al., 1970). Různé uspořádání a ultrastruktura buněk žláзовého epitelu také umožňuje rozlišovat žlázy parních a nuliparních samic (Fausto et al., 1997), nicméně je tato metoda poměrně náročná.

Ovária

Další metodou je počítání folikulárních dilatací (Lewis, 1965), přesnost metody však nebyla laboratorně testována, protože samice v chovu obvykle nepřežívají více cyklů (Ready et al., 1984).

Polovodova metoda je použitelná jen u některých druhů flebotomů, navíc ovariooly jsou jen zřídka kdy pitvány, protože jsou velmi malé. Podle Lewis et Mintera (1960, cit. dle Lewis, 1970) je možné rozlišit parní samice nálezem folikulárních reliktů (pozůstatek epitelu, který původně obklopoval oocyt) nebo dilatací z tuniky (původně obklopovala folikul), které jsou ale často ztraceny během pitvy. Dilatace z tuniky byly pozorovány u *L. flaviscutellata* a *L. davis* a folikulární relikt byl pozorován u *L. longipalpis*, *L. anthophora* a *P. papatasi* (Magnarelli et al., 1984). Polovodova metoda je použitelná také u *L. furcata* (Ready et al., 1984) a ovariooly mohou být použity ke kontrole nálezu parity na základě akcesorických žláz.

Série dilatací z tuniky a jejich počet se u komárů běžně používá k určení věku, ale pro flebotomy nebyla vypracována žádná metoda pro počítání dilatací (Detinova, 1962). Hlavním objektem vyšetřování ovárií je právě přítomnost folikulárních reliktů. Pokud jsou reliktů příliš malé a špatně rozeznatelné, k určení parity samic se používá například stav tukového tělíska, které je u nuliparních samic velké a někdy i viditelné skrz tělní stěnu, a malpighické trubice, kde se sleduje jejich zbarvení (hnědošedé, téměř čiré a čiré) (Lewis, 1965), nebo je také možné sledovat pouze obecný vzhled ovárií (Detinova, 1962).

Absence folikulárních reliktů je jednoznačným kritériem pro nuliparní samice. Kalyx a ovidukty jsou relativně hladké a jasné, některé slabě pomačkané a tracheoly jsou často nápadné. Naopak v parních samicích ovária obsahují hnědavou masu folikulárních reliktů, ovidukty a kalyx jsou relativně široké a pomačkané a tracheoly jsou málo nápadné (Lewis, 1965).

Genitální atrium

Poměrně novou metodou je rozlišování samic podle membrány vymežující genitální atrium. Samice různého fyziologického věku (čerstvě vylíhlé, po sání, po ovipozici) vykazují jasné rozdíly ve stavu membrán genitálního atria. Atrium také vykazuje stálé vlastnosti u jedinců stejného druhu a je vhodné i k druhové determinaci a teprve později se začalo používat k určení parity samic. Dnes se řadí mezi velmi přesné metody (Tang et Anez, 1996).

Genitální atrium je chitinózní struktura s tenkou membránou lokalizovanou mezi dvěma výběžky furky (Valenta et al., 1999). Atriální membrána je vybavená pásem mnoha trnů táhnoucích se středem a jejich pravděpodobnou funkcí je pomoc při průchodu vajec (Killick-Kendrick et al., 1994). Při napnutí membrány během ovipozice se trny přemístí a jejich distribuce tak může sloužit k rozlišení parních samic od nuliparních. Nuliparní samice mají napnutou atriální membránu s armaturou v rovině a nemají žádné záhyby podél okraje atria, zatímco parní samice mají dva zřetelné záhyby podél okraje atria. Na atriální membránu je během ovipozice vyvíjen silný tlak při průchodu vajíček, které ji napínají a deformují. Jeden až dva dny po sání krve může být vidět důlek uprostřed atria nebo nepatrný záhyb na jedné straně atriální membrány, což je zapříčiněno pářením, tato deformace však nesmí být zaměňována se vzhledem parních samic.

Žádná z předchozích metod pro rozpoznávání parních a nuliparních flebotomů nemůže být použita u gravidních samic. Metoda genitálního atria to naopak umožňuje a zdá se být velmi přesná a spolehlivá, nicméně vyžaduje velkou zručnost při pitvě (Tang et Anez, 1996). Laboratorně není zatím prokázáno, zda je tento znak permanentní, protože samice v laboratorních chovech většinou umírají po první ovipozici. Vyzkoušená je tato metoda u volně žijících zástupců druhů *L. migonei*, *L. youngi* a *L. spinicrassa* a dále byl tento znak laboratorně pozorován u *L. longipalpis* a *L. ovallesi* (Tang et Anez, 1996).

Souhrn

Metody u samic flebotomů jsou omezené pouze na rozlišení dvou skupin a to parní a nuliparní. Pitvy samic flebotomů odhalily, že všechny parní a vysoký poměr nuliparních samic vykazují podobnou reziduální sekreci akcesorických žláz, a proto je vzhled akcesorických žláz nespolehlivý pro věkové třídění, ale i přesto, že je tato metoda stále poměrně hojně používána. Naproti tomu snadno rozeznatelné změny v genitálním atriu (zmačkané u parních samic) a ováriích (nažloutlé s volnými ovariolami u parních samic) indikují, že tyto orgány mohou být spolehlivě použity k určení parity samic. Pro metodu

genitálního atria mohou být použity čerstvé, vysušené nebo i fixované vzorky (Anez et Tang, 1997) a pro určení parity je tato metoda zcela jistě nejpřesnější. Detinova metoda pomocí tracheol a Polovodova metoda počítání folikulárních dilatací jsou pro flebotomy nevhodné, protože ovária flebotomů nevykazují žádné zřejmé změny v tracheolárním sbalení a ani folikulární dilatace nemusí korelovat s paritou v přírodních podmínkách, i když při známých fyziologických podmínkách je obecný vzhled ovárií spolehlivý pro rozlišení nuliparních samic (Anez et Tang, 1997).

Ideálně mají nuliparní samice chybějící reziduální sekreci v akcesorických žlázách, nerozvolněné ovariooly v ováriích a nemají žádné přehyby na okrajích armatury genitálního atria. Parní samice mají neprůhledné akcesorické žlázy díky sekreci žluté granulace, volně sbalené ovariooly v ováriích a přehyby na genitálním atriu (Tang et Anez, 1996).

6. 4. Určování parity samic u tiplíků (*Culicoides*)

Rozlišování parních a nuliparních samic tiplíků je ze všech uvedených skupin nejjednodušší, protože není potřeba pitvy. Metoda laterální abdominální pigmentace je poměrně jednoduchá a pigment na abdominální stěně je u řady druhů vidět s pomocí obyčejné lupy. Kromě této metody však existují i jiné, které budou krátce popsány níže.

Laterální pigmentace abdomenu

Jedná se o jedinou metodu, která umožňuje rozpoznat nuliparní a parní samice bez jejich pitvy. Během vývoje ovariačních folikulů se na tkáních lemujících abdominální stěnu samic objevuje červená/hnědá pigmentace (v závislosti na druhu) a takové samice jsou hodnoceny jako parní. Zbarvení se vyvíjí během prvního ovariačního cyklu a je zřetelně viditelné, když se folikuly dostanou do pokročilého stádia vitellogenese (Tyndale-Biscoe, 1984). Protože se pigment vyvíjí postupně právě během prvního ovariačního cyklu, může sloužit k další separaci fyziologických stádií během prvního cyklu, a samice některých druhů, jako *Culicoides marmoratus*, mohou být dále rozděleny až do pěti kategorií podle stupně pigmentace a stádia trávení krve (Kay, 1973). Pigment se s věkem a dokončenými gonotrofickými cykly postupně akumuluje a vzniklé zbarvení trvá po celý zbytek života samice a nedochází k jeho blednutí. Podle míry pigmentace nemůže být sice určen přesný počet sání, avšak odlišení skupiny uniparních samic od skupiny multiparních je proveditelné (Akey et Potter, 1979).

Pigment může být produktem metabolických procesů a následné exkrece. Pigmentová granula jsou u krví krmených samic lokalizovaná primárně ve velkých epidermálních buňkách

ležících pod kutikulou a první vrstvou dlaždicových epitelových buněk. U autogenních samic byla po první autogenní snůšce také pozorována pigmentová granula, ale velmi roztroušeně a větší část pigmentace se u nich objeví až po sání krve. Největší rozdíl mezi samicemi krmenými a nekrmenými krví lze pozorovat na lateroventrálním abdomenu. U nekrmených krví obvykle nejsou pigmentová granula přítomná v buňkách mezi kutikulou a dlaždicovými epitelovými buňkami ventrálního abdomenu a jen zřídka jsou v tkáni pod vnější epidermis.

Zbarvení je nejlépe vidět přes pleurální membránu a u většiny samic je intenzivnější na anterodorzální a laterální (Liney et Braverman, 1986) části abdomenu a naopak světlejší posteriorním směrem a na ventrální střední linii (Dyce, 1968). Například u *C. variipennis* je nárůst pigmentace nejintenzivnější v anterolaterální části ventrálního abdomenu (Akey et Potter, 1979).

Existuje široká škála pigmentové intenzity u různých druhů, v různých populacích stejného druhu i v jedincích různého věku toho samého druhu, navíc se zbarvení mění i v průběhu sezóny a v závislosti na lokalitě. U některých druhů s tmavými abdomeny jako *C. circumscriptus*, *C. newsteadi*, *C. univittatus* (Bravermann et Mumcuoglu, 2009) a *C. bancrofti* a *C. antennalis* (Dyce, 1969), je pigmentace jen slabě viditelná nebo dokonce není vidět vůbec. Nejlépe je zbarvení viditelné u samic, které nejsou nasáté krví, a jejichž abdomen je zvětšený po nasátí cukrem (Tyndale-Biscoe, 1984). Naopak krví naplněné samice se hodnotí obtížně, protože pigment je překryt střevním obsahem, který postupem času tmavne. U gravidních samic tlačí zrající folikuly na abdominální stěnu, na které je díky tomu jasně viditelná pigmentace, koncentrovaná do intersticiálních drážek (Dyce, 1969), přesto však hodnocení gravidních samic může být problematické (Bravermann et Mumcuoglu, 2009). Dalším problémem při identifikaci parity u mrtvých samic je scvrklý abdomen, často však pomůže, pokud se samice ponoří do 70% etanolu (Kay, 1973).

Jako první popsal metodu odlišení nuliparních a parních samic pomocí zbarvení abdomenu Dyce (1969) u *C. victoriae*. Obecně je tato metoda používána hlavně u tiplíků (*Culicoides*), ačkoli abdominální pigmentace byla zaznamenána i u parních samic komárů druhu *Cx. annulirostris* (Kay, 1979). Nevýhodou metody je nemožnost určení počtu dokončených ovariálních cyklů (Akey et Potter, 1979), pro jejich určení se používá metoda počítání folikulárních dilatací, například u *C. marmoratus* (Kay, 1973) a *C. variipennis* (Akey et Potter, 1979). Pro určení parity se může také použít metoda tracheolárních klubíček, například u *C. variipennis* (Akey et Potter, 1979).

Nespornou výhodou této metody je i její použití na živém, chlazeném, hluboce zmraženém nebo alkoholem fixovaném materiálu (Dyce, 1969; Birley et Boorman, 1982).

Laterální abdominální pigmentace, vzor pigmentace v abdominálních tergitech (viz níže) a trávení krve, to vše usnadňuje hodnocení dokonce i mrtvých a seschlých jedinců (Potter et Akey, 1978).

Laterální abdominální pigmentace může být měřena na základě absorpce světla procházející přes různá depozita pigmentu v abdominálních segmentech, pigment však může být obtížně detekovatelný, pokud je absorpční hodnota nižší než 10 % (Linley et Braverman, 1986).

Samozřejmě jako u každé metody, i zde existují výjimky. Při mnoha výzkumech byly nalezeny pigmentované samice, původně hodnocené jako parní, ale po bližším prozkoumání (pitvou ovariol) byly přehodnoceny jako staré nuliparní. Pigment se patrně vyvíjí během zrání folikulů, a i v případě jejich degenerace přetrvává. Jedná se například o určité populace druhů *C. imicola* (Braverman et Mumcuoglu, 2009), *C. victoriae*, *C. marmoratus* a *C. variipennis* (Dyce 1969). Pigmentace ale není omezená jen na hematofágní druhy. U samic autogenních druhů *C. waringi*, *C. mackerasi*, *C. furens* (Linley et Braverman, 1984) a dalších se pigmentace vyskytuje také. Barva se projeví, když se folikuly dostanou do pozdního stádia III a stává se výraznější jak ovária zrají (Dyce et Murray, 1967, cit. dle Dyce, 1969).

Kromě rozlišení samic na parní a nuliparní, lze tuto metodu využít také pro analýzu věkové struktury populace (Braverman et al., 1985), která je důležitá k porozumění vektorové kompetence. V populacích je pravděpodobně více uniparních než multiparních samic (Mullens et Rutz, 1984).

Vzor pigmentace v abdominálních tergitech

Vznik pigmentace je vázán na dvě periody, první zhruba do 24 h po vylíhnutí a druhá po prvním sání s následným ovariálním vývojem. Pigment může být viditelný v různých formách. Může tvořit tři zřetelné laloky, jako je tomu u jediného druhu, u kterého je tento typ pigmentace prokázán pro rozlišení parity, u *C. variipennis*, nebo může být distribuován v úzkých obdélníkových skvrnách, jako u *C. furens*, u něhož pigmentace tergítů nemá žádný význam pro určování parity nebo i věku. Vzory se mohou lišit podle druhu, věku a parity, je však obtížné určit jednoznačně hranici pigmentových ploch. Výhodou metody je její lepší využitelnost u scvrklých vzorků než v případě laterální pigmentace (Linley et Braverman, 1984).

Ovária

Samice tiplíků s folikulami II a pozdějšího stádia mohou být rozlišeny podle rozdílnosti ve zbarvení a neprůhlednosti celistvých ovárií pozorovaných světelným mikroskopem. Ovária parních samic se zdají být poněkud nažloutlá a více matná než ovária nuliparních samic (Dyce, 1969).

Protože třídění na základě zbarvení abdomenu rozlišuje pouze samice do skupin parní a nuliparní, vyšetřují se ovariooly pro přítomnost dilatací, stejně jako u ostatních skupin hematofágních dvoukřídých. Folikuly prochází různými stádii vývoje během gonotrofického cyklu podobně jako je tomu u komárů (Detinova, 1962). Také po ovipozici u nich přetrvávají dilatace v ovariolách v místě, kde bylo vajíčko. Malinké ovariooly v ováriích tiplíků se však pitvají velmi obtížně, na rozdíl od separace nenasátých samic do nuliparních a parních kategorií na základě zbarvení abdomenu (Bravermann et Mumcuoglu, 2009). Pro zjednodušení se může využít olejové injekční techniky, ale i ta je u tiplíků manipulačně velmi obtížná (Hoc, 1996b).

Souhrn

Pozorování (Dyce 1969; Linley et Braverman 1986), že pigmentová granula jsou přítomna v krvi nekrmených samicích autogenních druhů rodu *Culicoides* během a po oogenezi, a přítomnost pigmentových granulí v samcích a krvi nekrmených samicích anautogenních druhů, jasně indikuje, že vznik pigmentových granulí je asociován i s dalšími procesy než jen těmi spojenými s trávením krve (Akey, 1987) a stěhuje tak jednoznačné odlišení parních samic. I přesto lze z načtené literatury soudit, že laterální abdominální pigmentace je velmi populární, celosvětově hojně používaná metoda. Jako jedna z mála nevyžaduje pitvu, a není proto časově ani finančně náročná. Pokud je abdomen samic příliš tmavý nebo pokud je vyžadováno rozlišení na více kategorií, provádí se pitvy pro zjištění přítomnosti folikulárních dilatací, jako u jiných skupin nematocerního hmyzu, ačkoli pro malou velikost tiplíků je tato metoda poměrně náročná.

7. Závěr

Krevsající zástupci nematocerního hmyzu jsou celosvětově rozšířenou skupinou, důležitou jak z medicínského tak i veterinárního hlediska, a to nejenom jako trapiči, ale především jako přenašeči různých původců onemocnění. Při epidemiologických studiích, kdy se vyšetřují jedinci určitého druhu na přítomnost přenášených patogenů, je časově a finančně náročné, pokud se vyšetřují všechny odchycené samice. Schopnost rozpoznat parní samice je proto velkou výhodou, a to v mnoha ohledech.

Problematikou určení parity samic se vědci zabývali již od první poloviny 20. století. Stěžejní práci přispěla Detinova (1962), od které se odvíjely práce řady dalších autorů. První a základní metody byly vymyšleny pro komáry a právě tyto metody byly postupem času modifikovány i pro další skupiny krevsajícího hmyzu.

Většina dosavadních metod je založená na pitvách samic, což je časově a přístrojově náročné a pitvy navíc vyžadují i značnou manuální zručnost. Nejznámější a nejspíše i jediná metoda nevyžadující pitvu, je metoda založená na zbarvení stěny abdomenu u tiplíků (rod *Culicoides*) a z toho důvodu je tato metoda u tiplíků nejpoužívanější. U komárů stále patří mezi nejpoužívanější metody metoda folikulárních dilatací nebo tracheolární sbalení ovárií a z novějších metod kutikulární hydrokarbonové analýzy. U muchniček se nejčastěji sledují malpighické trubice a u flebotomů, i přes značnou nepřesnost, akcesorické žlázy.

V rámci bakalářského studia jsem výše zmíněnou metodu laterální abdominální pigmentace použila u tiplíků druhu *Culicoides obsoletus* a věnovala jsem se populační dynamice parních a nuliparních samic získaných v rámci celorepublikového monitoringu výskytu tiplíků v souvislosti s šířením katarální horečky ovčí (BTV). S využitím chovů řady druhů flebotomů na naší katedře bych se chtěla v budoucnu pokusit vyvinout novou metodu pro rozlišování parních a nuliparních samic flebotomů, pokud možno bez nutnosti jejich pitev.

9. Seznam použité literatury

1. **Adler S., Mayrink W. (1961).** A gregarine, *Monocystis chagasi* n.sp., of *Phebotomus longipalpis*. Remarks on the accessory glands of *P. longipalpis*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 3: 230-238
2. **Adler S., Theodor O. (1935).** Investigations on Mediterranean kala azar VIII. Proceedings of the Royal Society (B). 116: 505-515
3. **Akey D. H. (1987).** Pigmentation associated with oogenesis in the biting fly *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae): light and elektron microscopy. Journal of Medical Entomology. 24: 106-114
4. **Akey D. H., Potter H. W. (1979).** Pigmentation associated with oogenesis in the biting fly *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae): Determination of parity. Journal of Medical Entomology. 6: 67-70
5. **Anderson J. F. (1964).** Methods of distinguishing nulliparous from parous flies and for estimating the ages of *Fannia canicularis* and some other cyclorrhaphous Diptera. Annals of the Entomological Society of America. 57: 226-236
6. **Anez N., Tang Y. S. (1997).** Comparison of three methods for age-grading of female Neotropical phlebotomine sandflies. Medical and Veterinary Entomology. 11: 3-7
7. **Bellamy R. E., Corbet P. S. (1974).** Occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes. Mosquito News. 34: 334-334
8. **Bellis G. A., Reid D. J. (1996).** Sampling bias in determining the parous rate of collections of *Culicoides brevitarsis* Kieffer and *C. wadai* Kitaoka (Diptera: Ceratopogonidae). Australian Journal of Entomology. 35: 319-322
9. **Birley M. H., Boorman J. P. T. (1982).** Estimating the survival and biting rates of haematophagous insects, with particular reference to the *Culicoides obsoletus* group (Diptera, Ceratopogonidae) in southern England. Journal of Animal Ecology. 51: 135-148
10. **Birley M. H., Rajagopalan P. K. (1981).** Estimation of the survival and biting rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 18: 181-186
11. **Blackmore J. S., Dow R. P. (1962).** Nulliparity in summer and fall populations of *Culex tarsalis* Coq. Mosquito News. 22: 291-294
12. **Braverman, Y., Linley J. R., Marcus R., Frish K. (1985).** Seasonal survival and expectation of infective life of *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae) in Israel with implications for bluetongue virus transmission, and a comparison of the parous rate in *C. imicola* from Israel and Zimbabwe. Journal of Medical Entomology. 22: 476-484
13. **Braverman Y., Mumcuoglu K. (2009).** Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola*

- Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen. *Veterinary Parasitology*. 160: 356-358
14. **Carpenter M. J., Nielsen L. T. (1965).** Ovarian cycles and longevity in some univoltine *Aedes* species in the Rocky mountains of western united states. *Mosquito News*. 25: 127-134
 15. **Cheke R. A., Dutton M., Avissey H. S. K., Lehane M. J. (1990).** Increase with age and fly size of pteridine concentrations in different members of the *Simulium damnosum* species complex. *Acta Leidensia*. 59: 307-314
 16. **Christensen H. A., Herrer A. (1980).** Panamanian *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) host attraction profiles. *Journal of Medical Entomology*. 17: 522-528
 17. **Christophers S. R. (1911).** The development of the egg follicle in anophelines. *Paludism*. 2: 73-88
 18. **Colless D. H. (1958).** Recognition of individual nulliparous and parous mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 52: 187
 19. **Cook P. E., Hugo L. E., Iturbe-Ormaetxe I., Williams C. R., Chenoweth S. F., Ritchie S. A., Ryan P. A., Kay B. H., Blows M. W., O'Neill S. L. (2006).** The use of transcriptional profiles to predict adult mosquito age under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18060-18065
 20. **Corbet P. J. (1959).** Recognition of individual nulliparous and parous mosquitoes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 53: 297
 21. **Cupp E. W., Collins R. C. (1979).** The gonotrophic cycle in *Simulium ochraceum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28: 422-426
 22. **Darsie R. F., Merino M. E. (1981).** The oviposition time of *Simulium downsi* trapped over a breeding stream in Guatemala (Diptera, Simuliidae). *Mosquito News*. 41: 129-132
 23. **Davies L. (1957).** A study of the age of *Simulium ornatum* Mg. (Diptera) attracted to cattle. *Bulletin of Entomological Research*. 48: 535-552
 24. **Davies L. (1963).** Seasonal and diurnal changes in the age-composition of adult *Simulium venustum* Say (Diptera) populations near Ottawa. *Canadian Entomologist*. 95: 654-667
 25. **De Meillon B., Sebastian A., Khan Z. H. (1967).** Cane-sugar feeding in *Culex pipiens fatigans*. *Bulletin of World Health Organization*. 36: 53-65
 26. **Desena M. L., Clark J. M., Edman J. D., Symington S. B., Scott T. W. (1999a).** *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) age determination by cuticular hydrocarbon analysis of females legs. *Journal of Medical Entomology*. 36: 824-830
 27. **Desena M. L., Clark J. M., Edman J. D., Symington S. B., Scott T. W., Clark G. G.,**

- Peters T. M. (1999b).** Potential for aging female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by gas chromatographic analysis of cuticular hydrocarbons, including a field evaluation. *Journal of Medical Entomology*. 36: 811-823
- 28. Detinova T. S. (1962).** Age-grouping methods in Diptera of medical importance with special reference to some vectors of malaria. World Health Organization, Monograph series. NO 47, Geneva, Switzerland.
- 29. Detinova T. S., Gillies M. T. (1964).** Observation on the determination of the age composition and epidemiological importance of populations of *Anopheles gambiae* Giles and *Anopheles funestus* Giles in Tanganyika. *Bulletin of World Health Organization*. 30: 23-28
- 30. Duke B. O. L. (1968).** Studies on factors influencing the transmission of onchocerciasis IV. The biting-cycle, infective biting density and transmission potential of forest *Simulium damnosum*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 62: 95-106
- 31. Dyce A. L. (1969).** The recognition of nulliparous and parous *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) without dissection. *Australian Journal of Entomology*. 8: 11-15
- 32. Fausto A. M., Khoury C., Maroli M., Mazzini M. (1997).** Ultrastructure of reproductive accessory glands in the female sandfly *Phlebotomus perniciosus* Newstead (Diptera: Psychodidae). *International Journal of Insect Morphology & Embryology*. 26: 121-128
- 33. Fox A. S., Brust R. A. (1994).** Rogue ovarioles and criteria for parity diagnosis in *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) from Manitoba. *Journal of Medical Entomology*. 31: 738-746
- 34. Garcia-Rejon J. E., Farfan-Ale J. A., Ulloa A., Flores-Flores L. F., Rosado-Paredes E., Baak-Baak C., Lorono-Pino M. A., Fernandez-Salas I., Beaty B. J. (2008).** Gonotrophic cycle estimate for *Culex quinquefasciatus* in Merida, Yucatan, Mexico. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 24: 344-348
- 35. Giglioli M. E. C. (1965).** The problem of age determination in *Anopheles melas* Theo. 1903, by Polovodova's method. *Cahiers Orstom*. 3-4: 157-177
- 36. Gillies M. T., DeMeillon B. (1968).** The Anophelinae South of the Sahara (Ethiopian Zoological Region). Second edition. South African Institute for Medical Research. 54:1-343
- 37. Gillies M. T., Wilkes T. J. (1963).** Observations on nulliparous and parous rates in a population of *Anopheles funestus* in east Africa. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 57: 204-213
- 38. Gillies M. T., Wilkes T. J. (1965).** A study of the age composition of populations of

- Anopheles gambiae* Giles and *A. funestus* Giles in north-eastern Tanzania. Bulletin of Entomological Research. 56: 237-262
39. **Gryaznov A. I. (1993).** Use of Sokolova, M. I. combinative method of estimating physiological age in blood-sucking black flies (Diptera: Simuliidae). Zoologicheskii zhurnal. 72: 51-58
 40. **Gryaznov A. I. (1995).** Age-grading in blackflies (Diptera: Simuliidae) by ovariole morphology. Bulletin of Entomological Research. 85: 339-344
 41. **Harrington L. C., Edman J. D., Scott T. W. (2001).** Why female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? Journal of Medical Entomology. 38: 411-422
 42. **Hoc T. Q. (1996a).** A method for the rapid recognition of nulliparous and parous females of haematophagous diptera. Bulletin of Entomological Research. 86: 137-141.
 43. **Hoc T. Q. (1996b).** Application of the ovarian oil-injection and ovariole separation techniques for age-grading haematophagous diptera. Journal of Medical Entomology. 33: 290-296
 44. **Hoc T. Q., Charlwood J. D. (1990).** Age determination of *Aedes cantans* using the ovarian oil injection techniques. Medical and Veterinary Entomology. 4: 227-233
 45. **Hoc T. Q., Schaub G. A. (1995).** Ovariole 'basal body' development and physiological age of the mosquito *Aedes aegypti*. Medical and Veterinary Entomology. 9: 9-15
 46. **Hoc T. Q., Schaub G. A. (1996).** Improvement of techniques for age grading hematophagous insects: ovarian oil-injection and ovariole separation techniques. Journal of Medical Entomology. 33: 286-289
 47. **Hoc T. Q., Wilkes T. J. (1995a).** Age determination in the blackfly *Simulium woodi*, a vector of onchocerciasis in Tanzania. Medical and Veterinary Entomology. 9: 16-24
 48. **Hoc T. Q., Wilkes T. J. (1995b).** The ovariole structure of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and its use in determining physiological age. Bulletin of Entomological Research. 85: 59-69
 49. **Hugo L. E., Quick-miles S., Kay B. H., Ryan P. A. (2008).** Evaluations of mosquito age grading techniques based on morphological changes. Journal of Medical Entomology. 45: 353-365.
 50. **Johnson P. T. (1961).** Autogeny in Panamanian *Phlebotomus* sandflies. Annals of the Entomological Society of America. 54: 116-118

- 51. Johnson P. T., Hertig M. (1961).** The rearing of *Phlebotomus* sandflies (Diptera: Psychodidae) II. Development and behavior of panamanian sandflies in laboratory culture. Annals of the Entomological Society of America. 54: 764-776
- 52. Jupp P. G. (1973).** Distinguishing nulliparous from parous females by the ovarian tracheation technique in four South African species of *Culex* (Diptera: Culicidae). Journal of the Entomological Society of Southern Africa. 36: 271-273
- 53. Jupp E. W., Collins R. C. (1979).** The gonotrophic cycle in *Simulium ochraceum*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 28: 422-426
- 54. Kal'chenko Ye. I. (1962).** On the bionomics of the mosquito *Culex pipiens molestus* Forsk. (Diptera, Culicidae). Entomological review. 41: 52-54
- 55. Kardos E. H., Bellamy R. E. (1961).** Distinguishing nulliparous from parous females *Culex tarsalis* by examination of the ovarian tracheation. Annals of the Entomological Society of America 54: 448-451
- 56. Kassem H. A., Hassan N. (2003).** Ovarian development and blood-feeding activity in *Phlebotomus bergeroti* Parrot (Diptera: Psychodidae) from Egypt. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 97: 521-526
- 57. Kay B. H. (1973).** Seasonal studies of a population of *Culicoides marmoratus* (Skuse) (Diptera: Ceratopogonidae) at Deception Bay, Queensland. Journal of the Australian Entomological Society. 12: 42-58
- 58. Kay B. H. (1979).** Age structure of populations of *Culex annulirostris* (Diptera: Culicidae) at Kowanyama and Charleville, Queensland. Journal of Medical Entomology. 16: 309-316
- 59. Killick-Kendrick R. (1978).** Recent advances and outstanding problems in the biology of phlebotomine sandflies. A review. Acta Tropica. 35: 297-313
- 60. Killick-Kendrick R., Tang Y., Killick-Kendrick M. (1994).** Phlebotomine sandflies of Kenya (Diptera: Psychodidae). IV. The armature in the genital atrium of female *Larroussius* as a mean of identification. Annals of Tropical Medicine Parasitology. 88: 433-437
- 61. Lehane M. J., Laurence B. R. (1978).** Development of the calyx and lateral oviduct during oogenesis in *Aedes aegypti*. Cell and Tissue Research. 193: 125-137
- 62. Lewis D. J. (1960).** Observations on *Simulium damnosum* in the southern Cameroons and Liberia. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 54: 208-223
- 63. Lewis D. J. (1965).** Internal structural features of some Central American phlebotomine sandflies. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 59: 375-385
- 64. Lewis D. J., Lainson R., Shaw J. J. (1970).** Determination of parous rates in

- Phlebotomine sandflies with special reference to Amazonian species. Bulletin of Entomological Research. 60: 209-219
- 65. Lima-Camara T. N., Honório N. A., Lourenco-de-Oliveira R. (2007).** Parity and ovarian development of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) in metropolitan Rio de Janeiro. Journal of Vector Ecology. 32: 34-40
 - 66. Linley J. R., Braverman Y. (1984).** The tergal pigmentation pattern of *Culicoides variipennis* and *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae). Journal of Medical Entomology. 21: 636-647
 - 67. Linley J. R., Braverman Y. (1986).** The lateral abdominal pigmentation in *Culicoides variipennis* and *Culicoides furens* (Diptera: Ceratopogonidae): quantitative measurement of its relationship to age and oogenesis. Journal of Medical Entomology. 23: 51-63
 - 68. MacDonald W. W. (1956).** *Aedes aegypti* in Malaya II - larval and adult biology. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 50: 399-414
 - 69. Magnarelli L. A. (1980).** Bionomics of *Psorophora ferox* (Diptera: Culicidae): seasonal occurrence and acquisition of sugars. Journal of Medical Entomology. 17: 328-332
 - 70. Magnarelli L. A., and Cupp E. W. (1977).** Physiological age of *Simulium tuberosum* and *Simulium venustum* (Diptera: Simuliidae) in New York, State, U.S.A. J. Journal of Medical Entomology. 13: 621-624
 - 71. Magnarelli L. A., Modi G. B., Tesh R. B. (1984).** Follicular development and parity in phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae). Journal of Medical Entomology. 21: 681-689
 - 72. Mahmood F., Crans W. J. (1998).** Ovarian development and parity determination in *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 35: 980-988
 - 73. McFarland G. C., Magy H. I. (1962).** Use of age determination techniques to locate sources of *Culex quinquefasciatus*. Mosquito and Vector Control Association of California. 30: 85-86
 - 74. Mer G. G. (1932).** The determination of the age of *Anopheles* by differences in the size of the common oviduct. Bulletin of Entomological Research. 23: 563-566
 - 75. Miller D. R., Weidhaas D. E., Hall R. C. (1973).** Parameter sensitivity in insect population modeling. Journal of Theoretical Biology. 42: 263-274
 - 76. Millest A. L., Cheke R. A., Howe M. A., Lehane M. J., Garms R. (1992).** Determining the ages of adult females of different members of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) by the pteridine accumulation method. Bulletin of Entomological Research. 82: 219-226

77. **Minter D. M. (1964).** Seasonal changes in populations of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) in Kenya. *Bulletin of Entomological Research*. 55: 421-435
78. **Morky J. E. (1980).** A method for estimating the age of field-collected female *Simulium damnosum* s.l. (Diptera: Simuliidae). *Tropenmedizin und Parasitologie*. 31: 121-127
79. **Mullens B. A., Rutz D. A. (1984).** Age structure and survivorship of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) in central New York State, USA. *Journal of Medical Entomology*. 21: 194-203
80. **Mutero C., Birley M. H. (1987).** Estimation of the survival rate and oviposition cycle of the field populations of malaria vectors in Kenya. *Journal of Applied Ecology*. 24: 853-863
81. **Nayar J. K., Knight J. W. (1981a).** The occurrence of ovariole dilatations in nulliparous mosquitoes: *Culex nigripalpus*. *Mosquito News*. 41: 281-287
82. **Nayar J. K., Knight J. W. (1981b).** Ovarian development in *Culex nigripalpus* and its implication for disease transmission. *Entomologia Experimentalis Et Applicata*. 29: 49-59
83. **Neville A. C. (1963).** Daily growth layers for determining the age of grasshopper populations. *Oikos*. 14: 1-8
84. **Norris L. C., Fornadel C. M., Hung W. C., Pineda F. J., Norris D. E. (2010).** Frequency of multiple blood meals taken in a single gonotrophic cycle by *Anopheles arabiensis* mosquitoes in Macha, Zambia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 83: 33-37
85. **Oda T., Wada Y., Mori A. (1978).** Follicular degeneration in unfed nulliparous females of *Culex tritaeniorhynchus*. *Tropical medicine*. 20: 113-122
86. **Penilla R. P., Rodriguez M. H., López A. D., Viader-Salvadó J. M., Sánchez C. N. (2002).** Pteridine concentrations differ between insectary-reared and field-collected *Anopheles albimanus* mosquitoes of the same physiological age. *Medical and Veterinary Entomology*. 16: 225-234
87. **Porter C. H., Collins R. C. (1985).** The gonotrophic cycle of wild *Simulium ochraceum* and the associated development of *Onchocerca volvulus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 34: 302-309
88. **Potter H. W., Akey D. H. (1978).** Pigmentation associated with oogenesis in the biting midge *Culicoides variipennis*: changes in abdominal tergite patterns. *Mosquito News*. 38: 499-504
89. **Post R. J. (1986).** The cytotaxonomy of *Simulium sanctipauli* and *Simulium soubrense* (Diptera: Simuliidae). *Genetica*. 69: 191-207
90. **Prabhaker N., Sutherland D. J. (1975).** Autogeny in *Culex pipiens pipiens* Linnaeus and

- Culex pipiens molestus* Forskal and its regulation by larval diet. (Diptera: Culicidae). Proc. New Jersey Mosquito Control Association.: 145
- 91. Ready P. D., Lainson R., Wilkes T. J., Killickkendrick R. (1984).** On the accuracy of age-grading neotropical phlebotomines by counting follicular dilatations: first laboratory experiments, using colonies of *Lutzomyia flaviscutellata* (Mangabeira) and *Lutzomyia furcata* (Mangabeira) (Diptera: Psychodidae). Bulletin of Entomological Research. 74: 641-646
 - 92. Rodriguez M. H., Bown D. N., Arredondo-Jimenez J. I., Villarreal C., Loyola E. G., Frederickson C. E. (1992).** Gonotrophic cycle and survivorship of *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) in southern Mexico. Journal of Medical Entomology. 29: 395-399
 - 93. Romoser W. S., Moll R. M., Moncayo A. C., Lerdthusnee K. (2000).** The occurrence and fate of the meconium and meconial peritrophic membranes in pupal and adult mosquitoes (Diptera: Culicidae). Journal of Medical Entomology. 37: 893-896
 - 94. Rosay B. (1961).** Anatomical indicators for assessing the age of mosquitoes: teneral adult (Diptera: Culicidae). Annals of the Entomological Society of America 54: 526-529
 - 95. Rosay B. (1969a).** Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes: dissection techniques and field application of methods. Mosquito News. 29: 419-423
 - 96. Rosay B. (1969b).** Anatomical indicators for assessing age of mosquitoes: changes in ovarian follicles. Annals of the Entomological Society of America 62: 605-611
 - 97. Ryšavý B, Černá Ž., Chalupský J., Országh I., Vojtek J.** Základy parazitologie. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1989. 216 s. ISBN 80-04-20864-9
 - 98. Scott T. W., Chow E., Strickman D., Kittayapong P., Wirtz R. A., Lorenz L. H., Edman J. D. (1993).** Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. Journal of Medical Entomology. 30: 922-927
 - 99. Scott T. W., Githeko A. K., Fleisher A., Harrington L. C., Yan G. (2006).** DNA profiling of human blood in Anophelines from lowland and highland sites in western Kenya. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 75: 231-237
 - 100. Schmidt M. L. (1965).** Autogenic development of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) from Egypt. Journal of Medical Entomology. 1: 356
 - 101. Schmidt J. R., Schmidt M. L. (1965).** Observation on the feeding habits of *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) under simulated natural conditions. Journal of Medical Entomology. 2: 225-230
 - 102. Schlein Y., Gratz N. G. (1973).** Determination of the age of some anopheline mosquitoes by daily growth layers of skeletal apodemes. Bulletin of World Health Organization. 49: 371-375

- 103. Self L. S., Pant C. P. (1968).** Parous/nulliparous condition of unfed *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* captured in exit traps. Mosquito News. 28: 62-64
- 104. Silver J. B.** Mosquito Ecology. Field Sampling Methods, Third Edition. Dordrecht, The Netherlands: Published by Springer (2008). ISBN 978-1-4020-6665-8
- 105. Smith S. M., Hayton A. (1995).** The gonotrophic-age structure of a population of the *Simulium venustum* complex (Diptera: Simuliidae) in Algonquin Park, Ontario. Great Lakes Entomologist. 28: 185-198
- 106. Snow W. F., Wilkes T. J. (1977).** Age composition and vertical distribution of mosquito populations in The Gambia, West Africa. Journal of Medical Entomology. 13: 507-513
- 107. Spencer M. (1979).** Age grouping of female *Anopheles farauti* populations (Diptera: Culicidae) in Papua New Guinea. Journal of Medical Entomology. 15: 555-569
- 108. Suzuki A., Tsuda Y., Takagi M., Wada Y. (1993).** Seasonal observations on some population attributes of *Aedes albopictus* females in Nagasaki, Japan, with emphasis on the relation between the body size and the survival. Tropical Medicine. (Nagasaki). 35: 91-99
- 109. Takaoka H., Ochoa J. O., Juarez E. L., Hansen K. M. (1982).** Effects of temperature on development of *Onchocerca volvulus* in *Simulium ochraceum*, and longevity of the simuliid vector. Journal of Parasitology. 68: 478-483
- 110. Tang Y. S., Anez N. (1996).** The genital atrium as a new character for distinguishing parous and nulliparous Neotropical sandflies. Annals of Tropical Medicine and parasitology. 90: 203-206
- 111. Tyndale-Biscoe M. (1984).** Age-grading methods in adult insects: a review. Bulletin of Entomological Research. 74: 341-377
- 112. Valenta D. T., Anez N., Tang Y., Killick-Kindrick R. (1999).** The genital atrium as a good taxonomic character to distinguish between species of phlebotomine sandflies (Diptera: Psychodidae) from Venezuela. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 93: 389-399
- 113. Volf P., Horák P., Čepička I., Flegr J., Lukeš J., Mikeš L., Svobodová M., Vávra J.** Paraziti a jejich biologie. Praha: Triton (2007). 318 s. ISBN 978-80-7387-008-9
- 114. Watanabe M., Tanaka I., Okazawa T., Yamagata Y., Ochoa J. O. A. (1980).** Notes on the age determination, ovariole changes and gonotrophic cycle of *Simulium ochraceum* in Guatemala. Japanese Journal of Sanitary Zoology. 31: 215-222
- 115. Watts R. B., Smith S. M. (1978).** Oogenesis in *Toxorhynchites rutilus* (Diptera: Culicidae). Canadian Journal of Zoology. 56: 136-139

116. **Wu D., Lehane M. J. (1999).** Pteridine fluorescence for age determination of *Anopheles* mosquitoes. Medical and Veterinary Entomology. 13: 48-52
117. **Yajima T. (1970).** A note on the formation of the "false" dilatation in *Culex tritaeniorhynchus summorosus* Dyar. Japanese Journal of Sanitary Zoology. 21: 224-225.
118. **Ziegler I., Harmsen R. (1969).** The biology of pteridines in insects. Advances in Insect Physiology. 6: 139-203

Sekundárni citace:

119. **Anderson J. R. (1987).** Reproductive strategies and gonotrophic cycles of black flies. pp 276-293. In: K.C. Kim and R.W. Merritt, eds. Black Flies. Ecology, Population Management, and Annotated World List. The Pennsylvania State University, University Park, PA.
120. **Arkhipova G. A. (1966).** The age structure of a population of blood-sucking blackflies in the Upper Kama region. Medical Parazitology, Parazitar. Bolezni. 35: 6-11 (In Russian)
121. **Bertram D. S., Samarawickrema W. A. (1958).** Age determination for individual *Mansonioides* mosquitoes. Nature. 182: 444-446
122. **Clements A. N. (1963).** The physiology of mosquitoes. 393 pp. Oxford, Pergamon Press (Int. Ser. Monogr. Pure appl. Biol. (Zool.) Vol 17)
123. **Davidson G. (1955).** Measurement of the ampulla of the oviduct as a means of determining the natural daily mortality of *Anopheles gambiae*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 49: 24-36
124. **Davies J. B., Corbet P. J., Gillies M. T., McCrae A. W. R. (1971).** Parous rates in some Amazonian mosquitoes collected by free different methods. Bulletin of Entomological Research. 61: 125-132
125. **Dolmatova A. V. (1942).** The life cycle of *Phlebotomus papatasi* Scopoli. (In Russian). Medskaya Parazitologija. 11: 52-70
126. **Dyce A. L., Murray M. D. (1967).** Autogeny in *Culicoides waringi* Lee and Reye and *Culicoides mackerrasii* Lee and Reye (Diptera: Ceratopogonidae) from Australia with notes on breeding places and behaviour. Journal of the Australian Entomological Society. 6:119-126
127. **Hosoi T. (1954).** Egg production in *Culex pipiens pallens* Coquillett. III. Growth and degeneration of ovarian follicles. Japanese Journal of Medical Science & Biology. 7: 111-127
128. **Klowden M. J. (1996).** Vector behavior. In The Biology of Disease Vectors, eds Beaty

- B. J. & Marquardt W. C. pp. 34-50. Niwot, CO: University Press of Colorado.
- 129. Lange A. B., Khok C. K. (1981).** Abortive oogenesis and physiological age in blood-sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae) (in Russian). Medskaya Parazitologija. 50: 48-56
- 130. Lange A. B., Khok C. K., Sokolova M. I. (1981).** The method of intraovarial oil injection and its use in the determination of the physiological age of females of blood-sucking mosquitoes (Diptera: Culicidae). Medskaya Parazitologija. 50: 51-53
- 131. Lewis D. J., Minter D. M. (1960).** Internal structural changes in some African Phlebotomine. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 54: 351-365
- 132. Perry E. L. (1912).** Malaria in the Jeypore Hill tract and adjoining coast land. Paludism. 5: 32-40
- 133. Polovodova V. P. (1941).** Changes in the oviducts of *Anopheles* with age, and a method of determining the physiological age of mosquitoes. Medskaya Parazitologija. 10: 387-396
- 134. Polovodova V. P. (1949).** The determination of the physiological age of female *Anopheles* by the number of gonotrophic cycles completed. Medskaya Parazitologija. 18: 352-355
- 135. Shoshina M. (1951).** The determination of a repeated gonotrophic cycle in sandflies. C. R. Acad. Sci. U. R. S. S. 78: 181-183 (in Russian)
- 136. Sokolova M. I. (1994).** A redescription of morphology of mosquito (Diptera: Culicidae) ovarioles during vitellogenesis. Bulletin of the Society of Vector Ecologists. 19: 53-68